ACTA ZOOLOGICA

INTERNATIONELL TIDSKRIFT FÖR ZOOLOGI

UTGIVEN AV

NILS HOLMGREN OCH TORSTEN PEHRSON
REDAKTÖRER
SAMT
BERTIL HANSTRÖM OCH PER ERIC LINDAHL

TRETTIOFEMTE ÅRGÅNGEN
VOL. 35 -1954

L.
5
54

GRUNDAD ÅR 1920 AV NILS HOLMGREN UNDER MEDVERKAN AV

O. ABEL, Wien.
A. APPELLÖF, Uppsala.
W. BATESON, London.
F. A. BATHER, London.
I. BOLIVAR, Madrid.
K. BONNEVIE, Kristiania.
E. W. MC BRIDE, London.
A. BRINKMAN, Bergen.
O. CARLGREN, Lund.
C. E. MC CLUNG, Philadelphia.
E. G. CONKLIN, Princeton.
A. DENDY, London.
F. DOFLEIN, Breslau.
L. DOLLO, Bruxelles.
H. FEDERLEY, Helsingfors.
E. GIGLIO-TOS, Cagliari.
C. GOLGI, Pavia.
S. GOTO, Tokyo.
B. GRASSI, Roma.
R. G. HARRISON, New Haven.
E. HÉROUARD, Paris.
R. HERTWIG, München.
K. HESCHELER, Zürich.
J. HJORTH, Oslo.
C. J. VAN DER HORST, Amsterdam.
F. A. JANSSENS, Louvain.
J. B. JOHNSTON, Minneapolis.
C. U. ARIËNS KAPPERS, Amsterdam.
R. KOEHLER, Lyon.
C. A. KOFOID, Berkeley.
A. KROGH, Köpenhamn.
W. LECHE, Stockholm.
F. R. LILLIE, Chicago.
J. LOEB, New York.
A. LUTHER, Helsingfors.
E. L. MARK, Cambridge, U. S. A.
TH. MORTENSEN, Köpenhamn.
TH. ODHNER, Stockholm.
H. F. OSBORN, New York.
H. PRZIBRAM, Wien.
P. RAMON Y CAJAL, Zaragoza.
S. RAMON Y CAJAL, Madrid.
E. REUTER, Helsingfors.
W. ROUX, Halle.
F. SARASIN, Basel.
C. PH. SLUITER, Amsterdam.
A. SMITH-WOODWARD, London.
H. G. STEHLIN, Basel.
TH. STUDER, Bern.
H. WALLENGREN, Lund.
M. WEBER, Amsterdam.
C. J. WESENBERG-LUND, Hillerød.
W. M. WHEELER, Boston.
E. B. WILSON, New York.
A. WIRÉN, Uppsala.
F. ZSCHOKKE, Basel.

STOCKHOLM · ALBERT BONNIERS FÖRLAG

VOL.
35
1954

STOCKHOLM. ALB. BONNIERS BOKTRYCKERI 1954

INNEHÅLL

LARS SILÉN: Notes on Lateral Organs in Pericaridan Crustacea 1

LARS SILÉN: On the Circulatory System of the Isopoda Oniscoidea . . . 11

ROLF PERRON: Untersuchungen über Bau, Entwicklung und Physiologie der Milbe *Hististoma laboratorium* Hughes 71

SAAD HAFEZ: The Placentome in the Buffalo 179

JOEL W. HEDGPETH: On the Phylogeny of the *Pycnogonida* 193

LARS SILÉN: Developmental Biology of *Phoronoidae* of the Gullmar Fiord Area 215

ANN-MARGRET PERJE: Genetic and Cytological Studies of *Drosophila funebris* FBR 259

RAGNAR FÄNGE and ERIC ÖSTLUND: The Effects of Adrenaline, Noradrenaline, Tyramine and Other Drugs on the Isolated Heart from Marine Vertebrates and a Cephalopod (*Eledone cirrosa*) 289

L.
5
54

VOL.
35
1954

NOTES ON LATERAL ORGANS IN PERACARIDAN CRUSTACEA

BY

LARS SILÉN

During an anatomical examination of isopods, particularly oniscoids, the author observed a pair of multicellular, gland-like bodies in the region close behind the mouth, which were previously unknown.

The conditions in *Ligia oceanica* (L.) (Ligiidae of the Oniscoidea) may serve as an example.

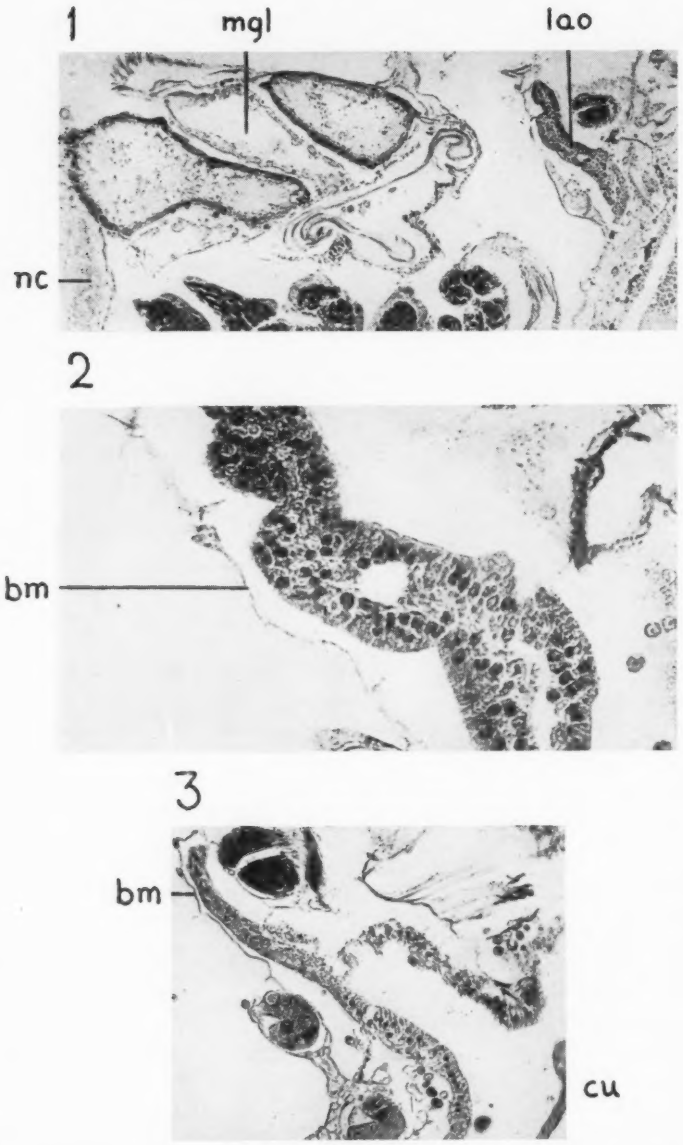
The organs in question are situated on a level with the end sac of the maxillary gland, close behind the level of the ganglion of the maxillulary segment (the end sac extends, in the isopods, a considerable distance anteriad from the external mouth of the organ on the maxilla) (fig. 1). They lie near the body wall of the laterally directed surface of the ventral fold of the thorax from which the mandibles issue immediately anteriorly to the present organs. Their areas of attachment thus face the spaces enclosed, on their dorsal and lateral sides, by the overhanging first pleurae.

In these places the body wall forms narrow invaginations (fig. 3). The hypodermis of such an invagination passes gradually inwards into an oblong body that does not differ, histologically, from the hypodermis except in so far as the nuclei are densely crowded here and are situated in several irregular layers in a plasm without discernible cell limits. The body extends further inwards as a long, sausage-like structure lying freely in the lateral blood lacune present between the maxillary gland and the lateral body wall (figs. 1, 2). The whole organ is surrounded by a distinct basal membrane representing a direct continuation of the basal membrane below the hypodermis (figs. 1—3). The body measures 300 μ in length and 50 μ in diameter. It is thus a structure of rather considerable size, here as well as in most of the species referred to below.

Within the portion of the organ situated nearest to the body wall there appears a lumen (dimly seen in fig. 1). In the opposite portion of the organ some round vacuoles are situated in the longitudinal axis of the organ (figs. 1, 2). Between the vacuoles the centre of the organ is partly of very loose structure, possibly the result of an unsatisfactory fixation.—No special enclosures were observed in the plasm.

The part of the organ extending into the lacune is connected by thin threads with adjacent parts of the fat tissue.

The dorsal nerve of the maxillulary ganglion extends through the narrow



Ligia oceanica. Cross sections. Fig. 1. Position of lateral organ (*lao*) in relation to body wall, maxillary gland (*mgl*), and nerve cord (*nc*). 90 ×.—Fig. 2. Inner lobe. Basal membrane (*bm*) is seen. 320 ×.—Fig. 3. Connection with hypodermis. The latter artificially retracted from cuticle (*cu*). 190 ×.

VOL.
35
1954

interspace between the end sac of the maxillary gland and the apodeme ventral to it and finally branches immediately above the dorsal end of the present organ. However, none of the large branches at least enters the organ itself (cf. fig. 8).

Despite the most careful examination no canals or pores were found to perforate the cuticle of the fixation area of the organ in *Ligia*, nor in the remaining isopods examined.

The same organs were found in all of the remaining isopods examined in this respect. They are: *Haplophthalmus danicus* Budde-Lund (Trichoniscidae), *Oniscus asellus* L. (Oniscidae), *Porcellio scaber* Latr., *P. pictus* Brandt, *Tracheoniscus rathkei* (Brandt), and *Cylisticus convexus* (De Geer) (Porcellionidae), *Armadillidium cinereum* (Zenker) (Armadillidiidae), *Cubaris officinalis* (Desm.) (Armadillidae), all of them belonging to the Oniscoidea; further, *Idothea sp.* (Valvifera) and *Asellus aquaticus* L. (Asellota). Only in *Paranthura sp.* (Anthuridea) and *Gnathia sp.* (Gnathoidea) were there some difficulties in establishing the presence of these organs. In both of them one pair of bodies differing in structure from the "usual" tissues was observed in the characteristic position. However, the fixation of the scanty material at my disposal and, consequently, the histological picture offered by the sections were too unsatisfactory to allow of certain determination.

In all of these forms the organs appear in exactly the same situation as in *Ligia* in relation to the mandible, the maxillulary ganglion and its dorsal nerve, and the maxillary gland. In the oniscoids they extend from the inner ends of invaginations of the body wall (figs. 7, 8), in *Idothea* and *Asellus* from the flat body wall (figs. 10, 11).

As to shape and histology the organs vary somewhat in different forms. In the oniscoids their greatest measurement varies between 100 and 150 μ in the medium-sized species, in *Asellus* it averages 70 μ in length. They are of a more or less broad and clumsy shape. In *Cylisticus* (fig. 7) and *Haplophthalmus* they have the shape of simple, even sacs, in *Armadillidium* (figs. 8, 9) they are sligthly lobated, in *Oniscus* (fig. 4) and *Porcellio* (fig. 5) distinctly lobated.

The histology is characterized by the amassment of numerous large nuclei in a plasm without discernible cell limits. In *Oniscus* (fig. 4) and *Porcellio* (fig. 5) the organs are compact, the nuclei being evenly dispersed in an apparently uniform plasm devoid of vacuoles or other hollows, and about the same holds true of *Haplophthalmus* and *Asellus* (fig. 13). In *Cylisticus* and *Armadillidium* (figs. 7—9) the plasm and nuclei are dense in the peripheral parts of the organs whereas their interior is occupied by vacuoles as well as irregular hollows.

In *Idothea* the organ — 175 μ in length, 12—15 μ in diameter—is a little more complicated (figs. 10—12). From its area of attachment at the body wall

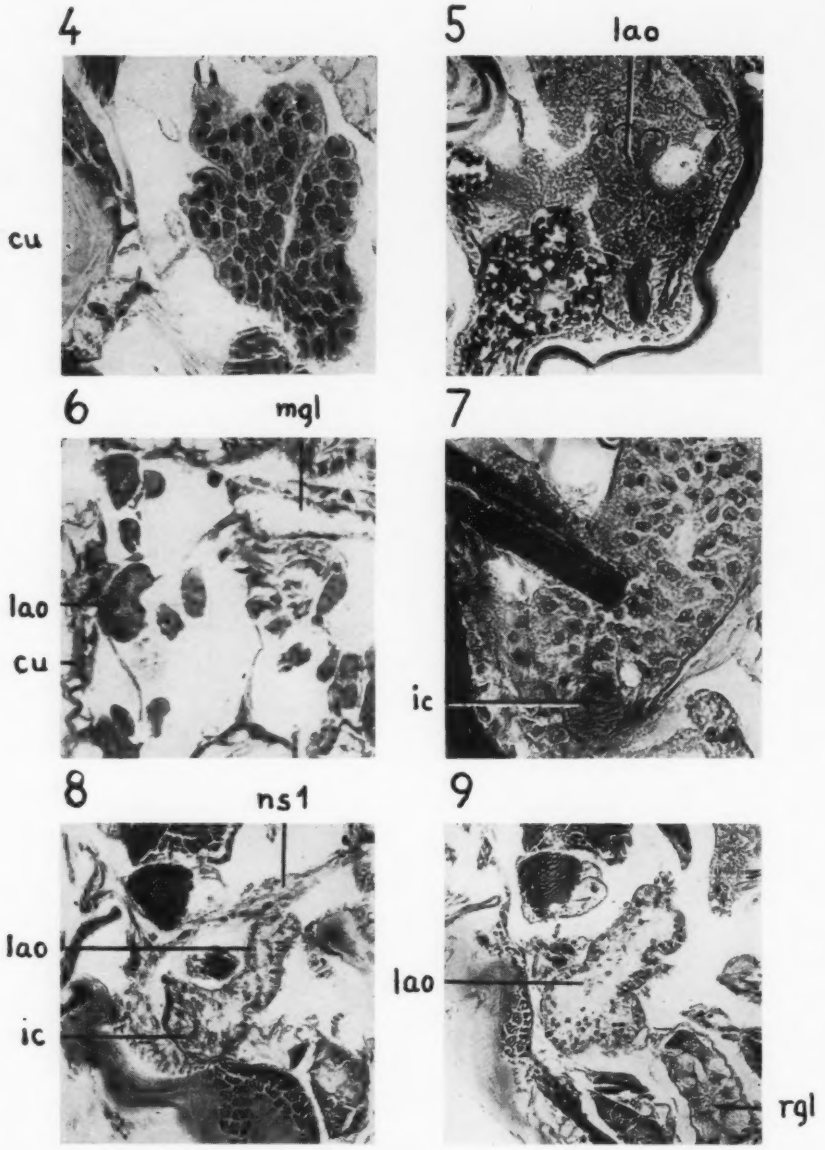
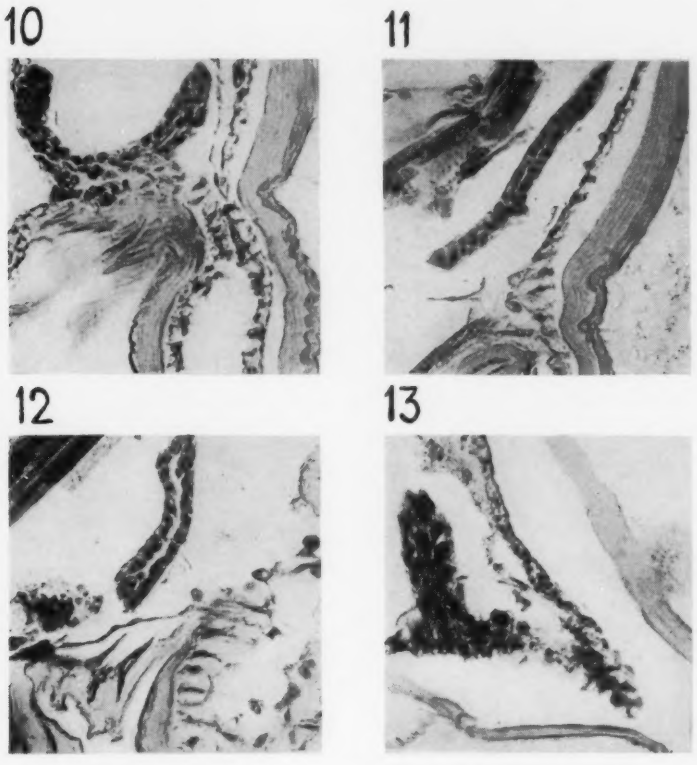


Fig. 4. *Oniscus asellus*. 320 ×.—Fig. 5. *Porcellio pictus*. Blood still occupies lacune round lateral organ. Fix. Flemming's strong fluid. 160 ×.—Fig. 6. *Porcellio scaber*. 1st larval stage from marsupium. Position of lateral organ in relation to body wall (*cu*) and maxillary gland (*mgl*). 320 ×.—Fig. 7. *Cylisticus convexus*. Lower portion of lateral organ connected with invagination of body wall (*ic*). 320 ×.—Fig. 8. *Armadillidium cinereum*. Position of lateral organ in relation to body wall, invagination from latter (*ic*), and dorsal nerve of maxillulary ganglion (*ns 1*). 160 ×.—Fig. 9. The same. inner portion. 160 ×. All figures from cross sections.

VOL. 35 1954



Figs. 10—12. *Idothea sp.* Connection of lateral organ with hypodermis (10), anterior (median) branch (11), posterior (lateral) branch (12). 320 ×.—Fig. 13. *Asellus aquaticus.* Connection with hypodermis. The latter artificially retracted from cuticle. 320 ×.—Cross sections.

one portion of it extends straight upwards into the lacune as an oblong, even sac. Another part forms a long, narrow projection obliquely upwards and slightly in the anterior direction, all the time lying close below the body wall. The nuclei are arranged in two regular layers, between which a narrow slit is left.

It seems worthy of note that HIRAIWA (1934, pp. 57—58, textfigs. 12, 13) pictured and described, unfortunately very briefly, what he called the maxillary glands in a rather curious way in *Epipenaeon*, a member of the isopod group Epicaridea not represented in the material examined by me. They were described as consisting of rather large bodies (larger in the female than in the male) of closely packed nuclei continuous with the hypodermis of the lateral body walls and extending into lacunes with their free ends. These facts do not agree at all with the structure of the maxillary glands in the isopods in general nor with the descriptions of them in the epicaridean forms *Bopyrus* and *Gyge*

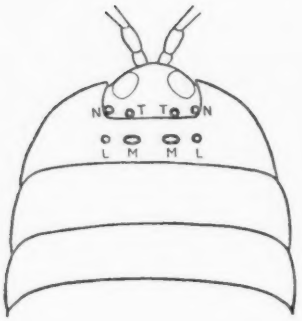


Fig. 14. *Ligia oceanica*. Anterior body portion in dorsal view. Positions indicated of NEMEC's organs (*N*), TER-POGHOSSIAN's organs (*T*), maxillary glands (*M*), and lateral organs (*L*).

given by ROGENHOFER (1908, pp. 2 ff., Pl. 1, figs. 1—6), where they are of the ordinary isopod type. On the contrary, they coincide in several characteristic features with the organs dealt with here and the suspicion lingers that they are, in reality, identical with them.

Already in the 1st larval stage of *Porcellio scaber* the organs proved to have reached the same general structure as in the adult animal and did not offer any particulars of interest (fig. 6).

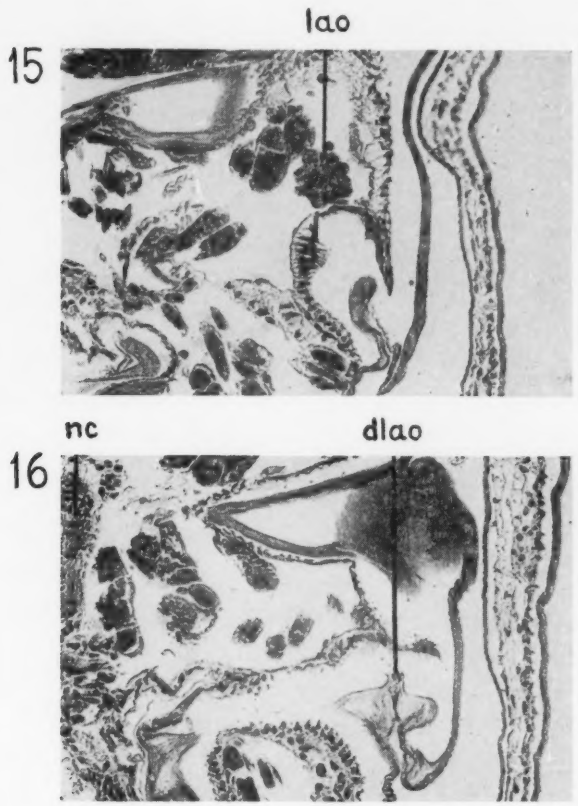
The organs do not contain any fat drops to judge from sections treated with osmium tetroxide (fig. 5).

The present organs should not be confused with "NEMEC's organs" or "TER-POGHOSSIAN's organs", which are situated in the head of the isopods not very far from them (cf. NEMEC 1896 and TER-POGHOSSIAN 1909; the latter organs are but incompletely treated and are often confused in the later literature), nor of course with the rosette glands. The situation of the former organs in relation to the maxillary glands is indicated in fig. 14.

Similar organs seem only to have been reported before from the Mysidacea, where VOGT (1935) detected one pair of what he called "Seitenorgane" in *Gastrosaccus* and *Praunus*. They are situated in the maxillulary segment at the wall connecting the ventral margin of the carapax present in this group with the thorax. Their attachment areas are thus turned inwards facing the space between the carapax and thorax. The organ constitutes a hemisphere, its flat side against the cuticle and its body swelling into the lacune inside it. Histologically it is characterized by the accumulation of a great number of large nuclei in several, irregular layers embedded in a uniform, somewhat striated plasm. In the centre of the organ the plasm close to the cuticle is free from nuclei. The tissue is continuous with the hypodermis and is surrounded by a distinct basal membrane. No exit duct was found.—Observations of my own on the same organs in *Praunus* confirm this description.

As is seen from this the present organs in the mysidaceans agree closely with those just described from the isopods. They have the ectodermal origin, position, and histological structure in common and can in all probability by assumed

VOL. 35 1954



Gammarus sp. 160 ×. Fig. 15. Lateral organ.—Fig. 16. Possible exit duct (*dlao*) of lateral organ; substance occupying it seen as dark strip.—Hypodermis artificially retracted from cuticle.—Cross sections.

to be homologous. VOGT's term "lateral organs" is consequently adopted for the corresponding organs of the isopods as well.

As the mysidaceans and isopods are both of them members of the peracaridans, it appeared desirable to ascertain whether lateral organs exist in other members of that group as well.

Of the amphipods *Gammarus sp.* and *Caprella sp.* were examined.—In *Gammarus* there appears a pair of organs, 50 μ in diameter, in the same position and with the same relations to the hypodermis as in the isopods (fig. 15). Their histology resembles rather closely that met with in *Oniscus,* large and vividly stained nuclei being densely placed in a homogeneous plasm, where no cell limits can be discerned. As is the case in most isopods, a narrow invagination of the body wall cuticle extends into the end of the organ. In *Gammarus* that invagination is perforated by a distinct canal, which is occupied by a sub-

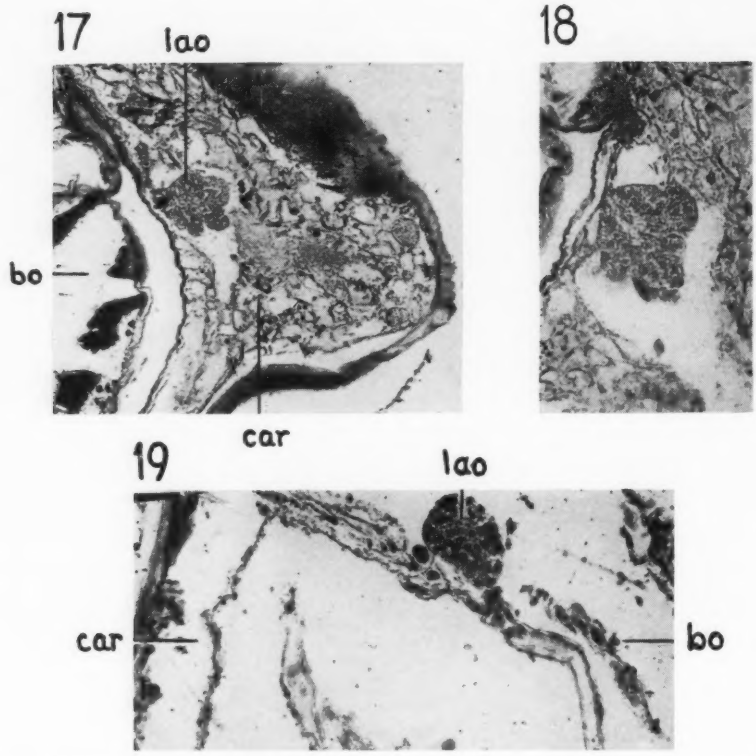


Fig. 17. *Apseudes spinosus*. Position of lateral organ in base of carapax (*car*; *bo* = body). Cross sectioned "exit duct" seen as dark spot in portion turned to cuticle. 135 ×.—Fig. 18. The same. Plasm near "exit duct" free from nuclei. 270 ×.—Fig. 19. *Diastylis boecki*. Lateral organ. 270 ×.—Cross sections.

stance stained a vivid red in Heidenhain's azan stain and thus contrasting with the surrounding cuticle stained a pure blue (fig. 16).—In *Caprella* there exists a corresponding pair of bodies. They are comparatively as well as absolutely much smaller. No ducts through the cuticle were observed.

Apseudes spinosus M. Sars was chosen to represent the Tanaidacea. Also here the same pair of organs occur, 60 μ in diameter (figs. 17, 18). They are situated a short distance down along the inner side of the small carapax. Histologically they offer nothing extraordinary: numerous nuclei are densely situated in a compact plasm. They are reached by cuticular invaginations, which are perforated by canals occupied by a substance with the staining properties just described for *Gammarus*.

In *Diastylis boecki* Zimmer of the Cumacea the lateral organs are likewise present (fig. 19). They are situated in the usual body region near the line where the carapax leaves the body. The portions of them attached to the

VOL. 35 1954

cuticle are narrow and then swell into evenly rounded, compact sacs protruding into the lacunes. They measure 70 μ in length and exhibit the usual histological characteristics. No traces of possible exit ducts were observed in the not too well fixated material.

It deserves mentioning that the present author has examined, in addition to the peracaridan groups, a cross section series of *Nebalia* of the Leptostraca kindly placed at his disposal by Dr Erik Dahl, of the Zoological Institute of the University at Lund. No structures were detected that in any way whatever could be placed in accordance with the lateral organs.

The present position is thus that the lateral organs occur in all of the peracaridan groups and in all their members satisfactorily examined in this respect but are not known in the case of any other crustaceans.

For obvious reasons it is entirely premature to state anything about the function of the lateral organs. A few facts should be stressed.—They protrude into lacunes and are thus washed by blood on all sides.—Histologically they exhibit no resemblance to the depuratory tissue described from along the walls of certain blood currents in various crustaceans. Bruntz (1903) and other authors who have stained isopods, amphipods, etc., vitally when looking for excretory organs and the like, have not obtained any staining in the body portion where the lateral organs are situated, nor did Vogt succeed in staining these organs in the mysidaceans vitally.—An invagination of the body wall reaches into one end of the organ in most forms and is sometimes distinctly seen to be perforated by a narrow canal, which is occupied by some sort of substance (secretion of the organ?). However, it was not possible to ascertain without doubt that this represents an exit duct.—The lateral organs occur in aquatic and terrestrial forms alike. They are thus not connected with the nature of the surrounding medium.

Vogt advanced but himself rejected the idea that the lateral organs of the mysidaceans might be vestigial maxillary glands. The impossibility of this idea is now further demonstrated by their presence also in forms possessing maxillary glands as well.

Vogt connected the lateral organs of the mysidaceans with the "dorsal organs" present in the juvenile animals of the same group but disappearing during their further development. According to him the origin and first development of these organs are similar.

When we turn to the "dorsal organs" described from juvenile stages of several other crustacean groups as well as from certain adult ones, however, we come to very unstable ground considering the differences of their structure as well as of the interpretations given to them. Surveys of the dorsal organs have been advanced by Grobben (1879, pp. 56 ff.), Nusbaum (1887, pp. 164 ff.) and Hansen (1921, pp. 66 ff.) (cf. further Terao 1919 and Piatakov

1925). HANSEN recorded the presence of such an organ in, i.a., certain species of *Idothea* among the isopods though apparently he did not make an anatomical research of it. In the *Idothea sp.* sectioned by me I have not succeeded in finding any trace of a special organ in the area indicated by HANSEN.

The persistent occurrence of the lateral organs in the different peracaridan orders demonstrated here and their absence in other crustaceans, can obviously be interpreted in two ways. Their absence in most crustaceans may be partly fictive and due to imperfect knowledge, either of the organs themselves or of hitherto unmasked homologues of them. On the other hand, it may be a fact that they do indeed occur only in the peracaridans. This would mean that they are of importance as phylogenetic characteristics though they still lack the background consisting in more clearly elucidated homologies and known function.

LITERATURE.

BRUNTZ, L. 1903. Contribution à l'étude de l'excretion chez les Arthropodes. Arch. Biol., 20.

GROBBEN, C. 1879. Die Entwickelungsgeschichte der Moina rectirostris. Arb. Zool. Inst. Univ. Wien, 2.

HANSEN, H. J. 1921. Studies on Arthropoda. I. Copenhagen.

HIRAIWA, Y. K. 1934. Studies on a Bopyrid, Epipenaeon japonica Thielemann. II. Reproductive and excretory organs. Journ. Sci. Hiroshima Univ., S. B., 1, Zoology.

NEMEC, B. 1896. Studien über Isopoden. II. Sitz.-Ber. K. Böhm. Ges. Wiss., Math.-Naturwiss. Classe, 38: 1.

NUSBAUM, J. 1887. L'embryologie de Mysis chameleo. Arch. Zool. Exp. et Gén., S. 2, 5.

PIATAKOV, M. L. 1925. Über das Vorhandensein eines Dorsalorganes bei Potamobius. Zool. Anz., 62.

ROGENHOFER, A. 1908. Zur Kenntnis des Baues der Kieferdrüse bei Isopoden und des Grössenverhältnisses der Antennen- und Kieferdrüse bei Meeres- und Süsswasserkrustazeen. Arb. Zool. Inst. Univ. Wien, 17.

TERAO, A. 1919. On the development of Panulirus japonicus v. Siebold. Rep. Imp. Fish. Inst. Tokyo, 14.

TER-POGHOSSIAN, A. 1909. Beiträge zur Kenntnis der Exkretionsorgane der Isopoden. Zeitschr. Naturwiss. Halle, 81.

VOGT, W. 1935. Über ein Seitenorgan der Mysideen. Zeitschr. Morph. u. Ökol. d. Tiere, 29.

VOL. 35 1954

ON THE CIRCULATORY SYSTEM OF THE ISOPODA ONISCOIDEA

BY

LARS SILÉN

CONTENTS.

1. Introduction 11
2. Heart 13
3. Aorta and Arteries 16
4. Lacunes of Body in General 28
5. Circulatory System of Pleopods 53
6. Discussion 60
7. Summary 65
Literature 67
Abbreviations 69

1. INTRODUCTION.

Our knowledge of the circulatory system of the isopods in general is mainly based on investigations carried out during the 19th century. Important communications were made by AUDOUIN & MILNE EDWARDS (1827), RATHKE (1843), KOWALEVSKY (1864), WAGNER (1865), SARS (1867), and DOHRN (1870a and 1870b). The culmination of this era is represented by DELAGE'S (1881) fine work on the circulation in the "Edriophthalms", still the main source of information concerning the present subject.

A variety of isopod types were dealt with by these authors. However, the oniscoids were considered to a small extent only. AUDOUIN & MILNE EDWARDS and DELAGE examined *Ligia*, and the sole treatise on a true terrestrial form is that of WAGNER on *Porcellio*.

Later works only touch on special details. They will be quoted below in the respective cases.—NUSBAUM (1886) and MCMURRICH (1895) have given some information concerning the ontogeny of the heart.

The methods employed by the first-mentioned authors consisted exclusively in observations on the living animal as well as in injections of a colour fluid into the circulatory system with subsequent microdissections whereas the thin sectioning method has been used hardly at all in this connection.

A renewed examination of the circulatory system of the isopods and, in particular, the oniscoids, could thus be expected to reveal new facts of importance for an estimation of the relations of the oniscoids. This comparison is of special interest as it concerns terrestrial forms with aquatic relatives. Among the few types of the, fundamentally, aquatic crustaceans that have

adopted a terrestrial mode of life, the isopods as represented by the oniscoids hold an exceptional position as a complete adaptation to terrestrial life has taken place there. The organs concerned with the metabolism and among them the system of transport can be expected to indicate the degree and nature of alterations in structure that have arisen in connection with this change of medium.

The oniscoids offer a graded series of forms exhibiting a more or less complete transition to terrestrial life. *Ligia oceanica* (L.) among the Ligiidae lives an amphibious life at the seashore. The Trichoniscidae (*Haplophthalmus danicus* Budde-Lund, etc.) live in wet earth and can likewise be called amphibious (VERHOEFF 1921). The Oniscidae and Porcellionidae (e.g., *Oniscus asellus* L., *Porcellio scaber* Latr., *P. pictus* Brandt, *Tracheoniscus rathkei* (Brandt), *Cylisticus convexus* (De Geer)) live wholly in the air. However, they have won their freedom from the water only at the price of perpetually carrying with them a small quantity of water for the sake of respiration. About the same holds true of the Armadillidiidae (i.a., *Armadillidium cinereum* (Zenker)). The Armadillidae (e.g., *Cubaris officinalis* (Desm.)) are freed even from this last remnant of the aquatic mode of life of their ancestors. Still other oniscoids are able to endure even the hardships of the desert.

VOL. 35 1954

The members of the suborder Oniscoidea just specified were examined by the present author, alive as well as on sections. Larval stages of *Haplophthalmus* and *Porcellio* were investigated as well. *Cubaris* was collected in 1949 during a stay at the Station Marine d'Endoume in Marseilles, the remaining forms in Sweden. For comparison representatives of several other suborders of the isopods were studied. They are as follows. Gnathiidea: *Gnathia* sp. Anthuridea: *Paranthura* sp. Asellota: *Asellus aquaticus* L. Valvifera: *Idothea* sp. Flabellifera: *Sphaeroma* sp. *Asellus* is a fresh-water form, the remaining species marine. *Gnathia, Paranthura,* and *Sphaeroma* were collected at Marseilles, *Idothea* and *Asellus* in Sweden. The suborders left aside are the small group of the Phreatoicidea and the aberrant, parasitic Epicaridea. DELAGE has described the circulatory system of *Bopyrus* belonging to the latter group.

A very good fixation of the terrestrial forms was obtained with SMITH's potassium bichromate solution or FLEMMING's strong fluid; this refers to the fat tissue, in particular, which is easily destroyed by other fluids but the retention of which in its original extension is of great importance when defining the lacunar blood currents. The fluids of PETRUNKEWITSCH and BOUIN proved to be somewhat less good, that of CARNOY distinctly inferior. PETRUNKEWITSCH, BOUIN, and BOUIN-HOLLANDE gave the best results for the amphibious and aquatic forms. Most specimens were immersed complete in the fixation fluid in order to make the blood remain in the spaces ordinarily occupied by it and thus mark out its natural courses as far as possible. I.a., at least most of the vessels when empty cannot be identified for certain on

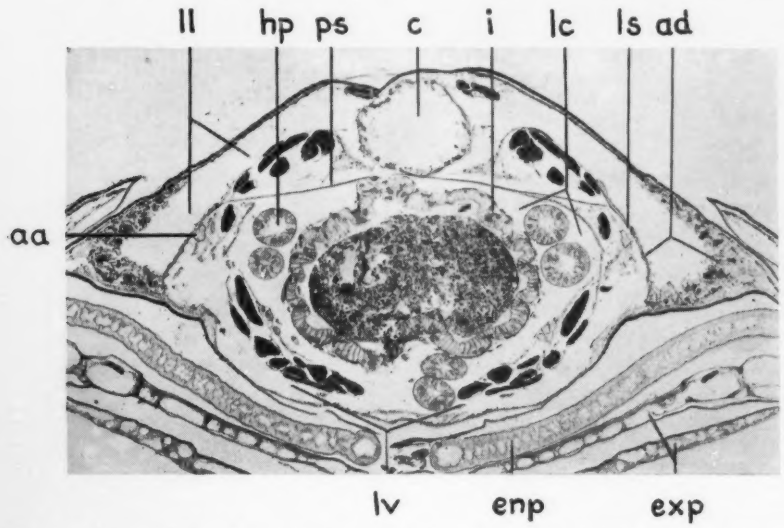


Fig. 1. *Ligia oceanica*. Cross section of abdomen. Lateral lacunes opening into pericard; central and ventral lacunes and lacunes of pleopodal endo- and exopodites; heart and abdominal arteries. 22 ×.

sections. For the staining HEIDENHAIN'S azan was mostly employed but HEIDENHAIN'S iron hematoxylin (sometimes with eosin or acid fuchsin as counterstains) and BODIAN'S protargol method were tried as well.

2. HEART.

Though the position and structure of the heart in the isopods have been treated by several authors, there are some points to be stressed or added.

The heart is situated far caudally here, as is well known, in connection with the abdominal limbs serving as respiratory organs (fig. 1). In most isopods it comprises the portion of the dorsal vessel situated in the anterior part of the abdomen or the posterior part of the thorax, its length corresponding to 1/5 or, at the most, 1/4 of the body length.

Already DELAGE remarked that the heart is unusually long in *Ligia*. In fact, this holds true of all the oniscoids examined by the present author. It appears to be characteristic of this group as compared with the remaining isopods that the heart extends from the 5th abdominal segment forward to the 5th or 4th thoracic segments, a distance corresponding to about 1/3—1/2 of the body length (cf. the table below and figs. 2—4). Though this difference in proportions can be partly correlated, in certain cases, with differences in the ratio of length of abdomen/length of thorax—forms such as gnathoids

and anthuroids possessing a particularly short abdomen—this does not suffice to explain the difference.

The volume of the heart is of interest in this connection. An attempt to present direct figures for it calculated from the measurements obtained from sections would mean a false exactitude as is evident from the uncertainty of many factors involved. However, it finds rather good—though of course approximate—expression in the following table giving the ratios of height of heart/height of body (measured at the thickest portion of the heart, generally about the thorax-abdomen border; the cross section is, largely, tubular) and of length of heart/length of body in a number of isopods.

	Height of heart / Height of body	Length of heart / Length of body
Ligia	0.27	0.43
Haplophthalmus	0.22	0.32
Oniscus	0.28	0.38
Porcellio pictus	0.25	0.33
Cylisticus	0.27	0.44
Armadillidium	0.25	0.33
Cubaris	0.28	0.4
Gnathia	0.2	0.22
Paranthura	0.25	0.16
Asellus	0.17	0.25
Idothea	0.14	0.23
Sphaeroma	0.22	0.28

VOL. 35 1954

These figures demonstrate that the heart volume is invariably considerably greater in relation to the body volume in the terrestrial forms than in the aquatic ones. This is even clearer if we pay regard to the fact that the heart is equilinear throughout most of its extension in the oniscoids whereas the aquatic types exhibit often considerable deviations from this uniformity. The extreme is represented by *Paranthura,* where the heart diameter almost immediately and rapidly diminishes in both directions from the point where the greatest diameter referred to in the table is found. *Sphaeroma* comes closest to the oniscoids in regard to the measurements of the heart as well as in its comparatively uniform thickness but the difference is distinct, nevertheless.

The previous statements concerning the characteristic low number (2) as well as alternating and oblique position of the ostia in the oniscoids, are confirmed. One exception was found. In *Ligia* there is a third ostium situated in the same side as the first one, in the 2nd abdominal segment (fig. 3).

In GADZIKIEVICZ's (1905) work on the histology of the heart of certain malacostracs, i.a. isopods, one point deserves special attention. That author observed to a certain extent that there is a tissue inside the heart consisting of

large, bubble-shaped cells. This tissue is indeed very striking. According to my observations it coincides in every detail with the common fat tissue of the body. It contains, i.a., numerous fat drops (figs. 37, 38). GADZIKIEVICZ explained it as formed by the "Ablagerung und Verschmelzung von Blutkörperchen mit der inneren Herzwandhülle". This seems rather probable as, for instance, LAZARENKO (1925, pp. 489 ff.) has demonstrated that blood cells in crustaceans can be transformed into fat cells.—The tissue is referred to below as the fat tissue of the heart.

The position and extension of the tissue vary considerably within different species as well as in different specimens of one and the same species. Some general rules can be discerned.

The tissue was present in all the oniscoids examined (figs. 22, 23, 37, 38). Here the cells are arranged round the interior surface of the heart and increase in number posteriad. In full-grown specimens collected in the summer and autumn (in Sweden) they are extremely numerous and form a compact body wholly occupying the heart lumen from its posterior end, past the posterior ostium (in *Ligia* the two posterior ostia) to the posterior margin of the anterior ostium. From there a narrow, central empty space extends anteriad, slowly widening. Only the anteriormost end of the heart is entirely devoid of fat cells. *Haplophthalmus* exhibits somewhat deviating conditions in so far as the fat tissue anterior to the compact posterior body forms a gradually narrowing rod along the dorsal side of the heart (figs. 24, 40). No changes have taken place in the structure of the muscles in the large heart portion wholly occupied by the fat tissue.

Already the latter fact indicates that the heart lumen only momentarily or periodically contains any considerable amount of fat tissue. Further, the fat cells are absent or sparse in young specimens as well as in full-grown ones captured in spring before or soon after they have left their winter quarters.

In the members of the remaining isopod groups dealt with here, fat cells are sparse or absent in the heart. No differences were observed as to the extension of the tissue in specimens collected on different occasions. In *Gnathia* and *Idothea* the cells form a narrow, equilinear rod along the ventral heart wall, in *Sphaeroma* a dorsal and a ventral strip partly fusing across the heart lumen. Moreover, single fat cells appear irregularly at the remaining heart walls. The few fat cells observed in *Paranthura* and *Asellus* hold the latter position.

The conditions related combine to indicate that the fat tissue of the heart represents a storage of nourishment well developed in the oniscoids, i.e. forms that owing to their terrestrial mode of life are exposed to radical changes during the year as regards the food supply, changes that are not at all or, at least, considerably less felt by their aquatic relatives. The present research was in no way directed towards the certainly intricate problem of the storage

of nourishment. However, in this connection it is worthy of note that, as can be discerned from sections, the fat drops are much more numerous in the body in general in summer and autumn specimens of the oniscoids than in spring specimens. This is a point further strengthening the assumption—already probable for theoretical reasons—that there exists a marked seasonal variation of the storage of nourishment precisely in the isopods with terrestrial habits.

3. AORTA AND ARTERIES.

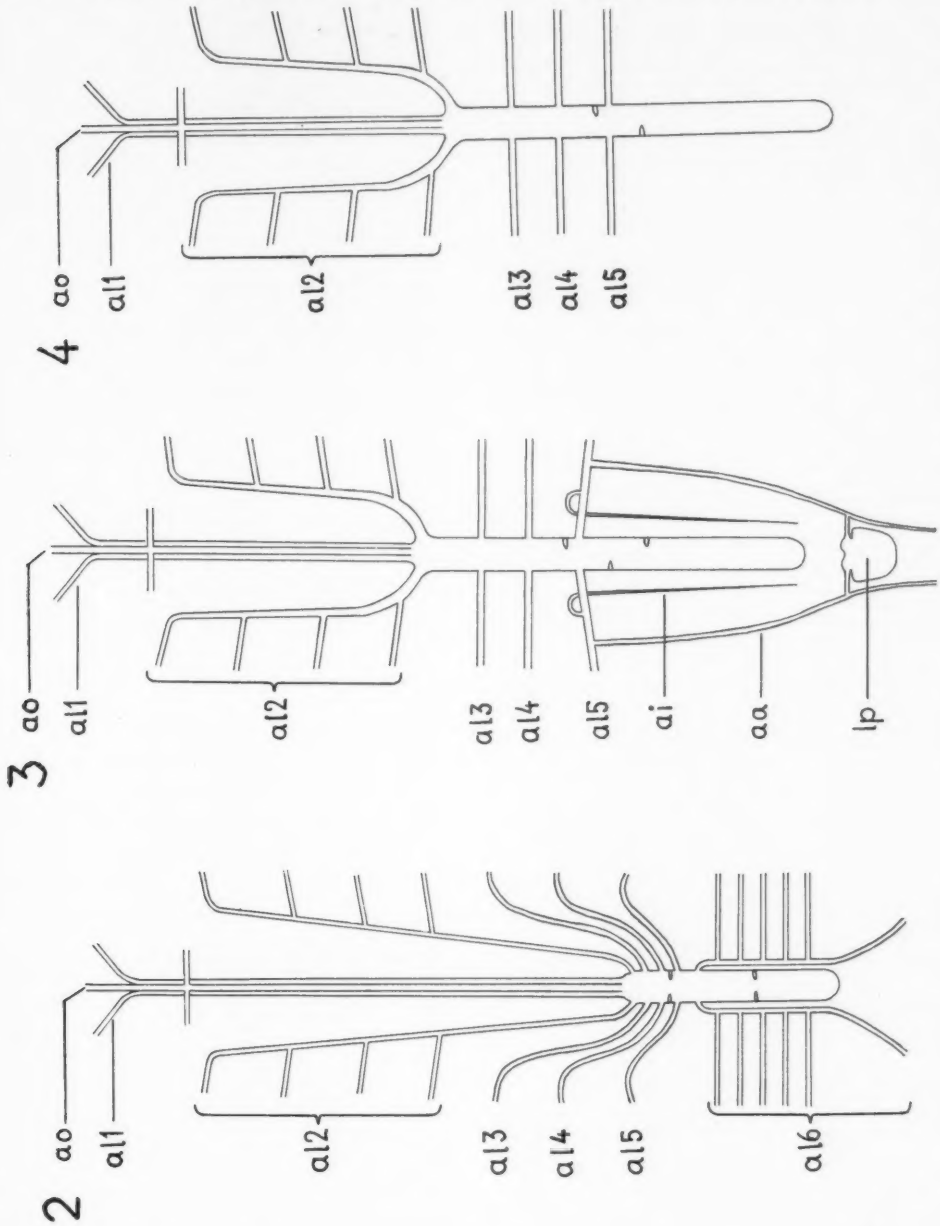
A description of the arterial system in *Ligia* will form the introduction to this chapter for two reasons. It is the only oniscoid of which we already have a comparatively complete picture in this regard, viz. that given by DELAGE (1881). Further, the arterial system of the remaining oniscoids appears, in many respects, as a reduced copy of that of *Ligia*.

As one single vessel, the a o r t a, all older authors have described a course of blood extending from the anterior end of the heart in the straight rostral direction along the dorsal side of the thorax. GADZIKIEVICZ (1905, pp. 214—216, textfigs. 1—6), when examining the structure of the heart, found that three vessels, intimately connected but with wholly separate lumina, issue from this part of the heart in the three genera examined by him, viz. *Porcellio*, *Idothea*, and *Gnathia*. This observation appears to have been overlooked in the later literature.

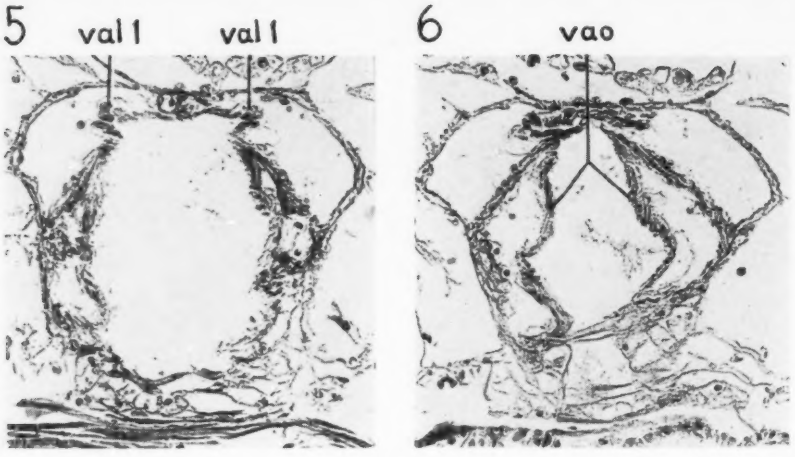
In fact, the structure traditionally called the aorta consists of three superficially indistinguishable vessels in almost its whole extension, i.e. from the distal end of the heart to the dorsodistal end of the "stomach" (preventricle), where they separate (figs. 2—4). This is the case in all oniscoids as well as in the remaining isopods examined by the present author except *Asellus*, where the two lateral vessels are absent.

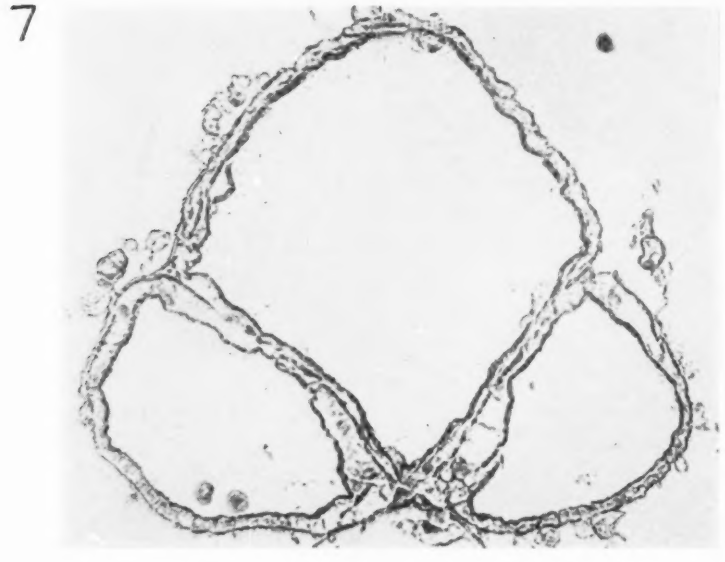
Ligia is the most favourable object for an examination of the interrelations of these vessels owing to their unusual size. Here it can be distinctly seen that each vessel has a wall of its own (fig. 7). The three vessels are connected by a surrounding thin layer of cells representing a direct continuation of the adventitia of the heart. The same thing appears in the remaining species though the connecting and covering layer is considerably thinner and thus not so easily perceived (fig. 8). An exception is *Idothea*, where the layer is as thick as in *Ligia* in spite of the much smaller size of the organ. Thus GADZIKIEVICZ has not touched upon a feature peculiar to *Idothea* exclusively when stating: "Bei Idothea gehen vom vorderen Herzteil 3 Arterien aus — — —, hier sind sie aber nicht verschmolzen, sondern nur durch eine äussere Hülle miteinander verbunden."

VOL. 35 1954



Central vessel system in aquatic isopod type (fig. 2), *Ligia oceanica* (fig. 3), and terrestrial oniscoid (*Porcellio pictus*) (fig. 4), i.a. showing gradual reduction of abdominal portions. Fig. 2 represents a general construction based on the conditions in Anthuridea—Flabellifera—Valvifera, from which *Gnathia* and *Asellus* differ in certain, though not fundamental respects (cf. the text).





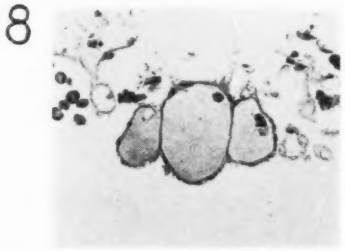


Fig. 5. *Ligia occanica*. Valves of 1st lateral arteries at departure from heart. 160 ×.—Fig. 6. The same. Valves of aorta at departure from heart. 160 ×.—Fig. 7. The same. Cross section of aorta and 1st lateral arteries in 3rd thoracic segment. 320 ×.—Fig. 8. *Oniscus asellus*. Cross section of aorta and 1st lateral arteries in 3rd thoracic segment. 135 ×.

VOL.
35
1954

The valves of the mouths of the three vessels in the heart are not identically arranged as one might be misled to think by GADZIKIEVICZ's textfig. 4. The median one is provided with one pair of very large valves, which are situated perpendicularly, whereas the two lateral ones have each one pair of considerably smaller valves placed horizontally in the same way as in the subsequent lateral arteries (figs. 5, 6).

These conditions indicate that the three vessels in question have not originated from a subdivision of the dorsal vessel but that the two lateral ones represent the first pair in the series of lateral arteries. The median vessel alone is the true aorta corresponding to the dorsal vessel.

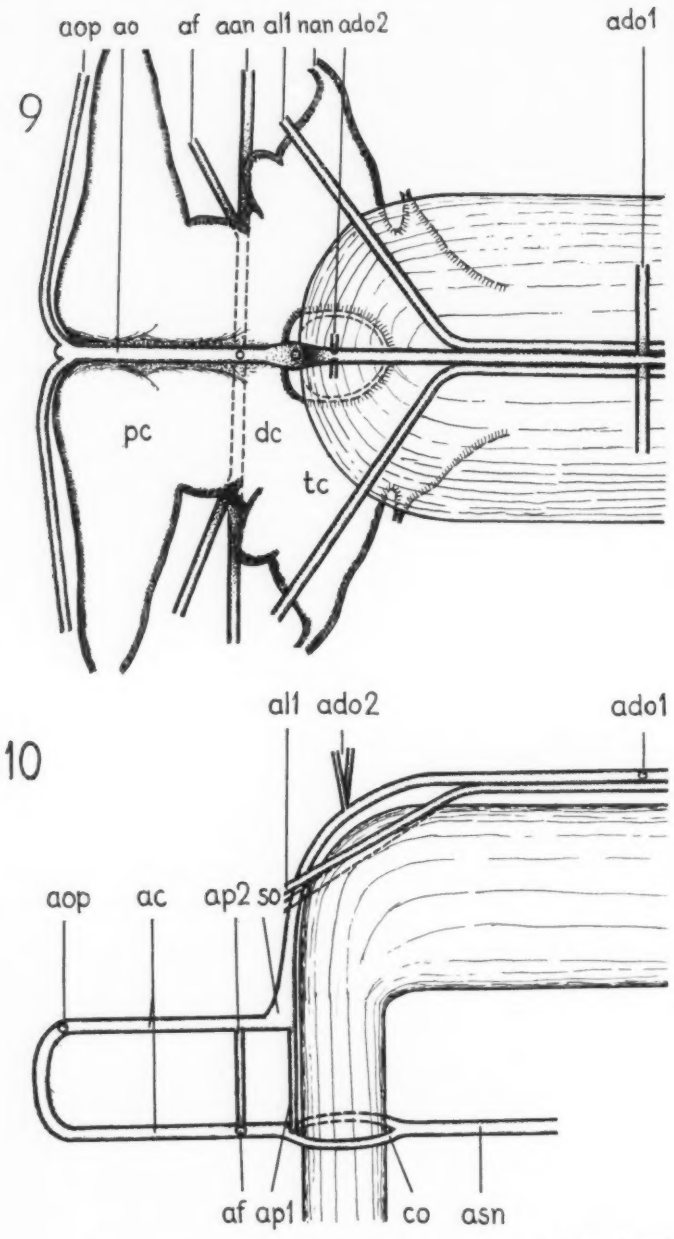
In *Ligia* the aorta *sensu strictu* and its branches offer the following picture (figs. 3, 9, 10).

The aorta extends undivided to the 1st thoracic segment. There it gives rise to a pair of lateral branches extending in opposite directions along the dorsal body wall. They can be callad a a. d o r s a l e s p o s t e r i o r e s. They form a number of branches extending and opening among the dorsoventral muscles.—I have failed to observe the anastomosing of each branch with a similar branch issuing from the 2nd lateral arteries described by DELAGE (op. cit., p. 63, pl. 5, fig. 1).

Immediately at the dorsoanterior margin of the stomach the aorta sends one pair of narrow, short branches in the dorsal direction (a a. d o r s a l e s a n t e r i o r e s). Immediately rostrally to this point it descends steeply along the anterior margin of the stomach and reaches the brain. In the angle between the oesophagus and the brain it dilates into a large sinus, which I call the s i n u s o e s o p h a g i. From there the aorta extends further rostrad in the bottom of a distinct median furrow in the dorsal surface of the brain (this is thus the vessel observed in that position by WALKER 1935, p. 204, when describing the morphology of the *Oniscus* brain), turns round its rostral margin and extends caudad below the brain. In this way an a r c u s c e p h a l i c u s a o r t a e is formed. Having reached the oesophagus the aorta divides into two branches encircling the former and fusing again on its posterior side into one vessel that extends further backwards below the nerve cord (this latter portion is incomplete in *Ligia,* absent in other oniscoids, cf. below). These structures are DELAGE's (op. cit., p. 64) "collier oesophagien" (c i r c u l u s o e s o p h a g i) and the distal part of the "artère prenervienne" (a. s u b n e u r a l i s).

Two perpendicular vessels connect the dorsal and ventral portions of the cephalic arc.

One runs straight downwards from the oesophageal sinus, in the space left between the concave posterior margin of the tritocerebrum and the anterior wall of the oesophagus, and enters the ventral part of the arc close rostrally to the oesophageal circle; this vessel can be called a. p e r p e n d i c u l a r i s



Figs. 9—10. *Ligia oceanica*. Diagrams of arteries in head, in dorsal and lateral view respectively. Brain, oesophagus, and "stomach" indicated.

VOL. 35 1954

posterior. It has probably escaped attention owing to its concealed position.

The second, very narrow vessel runs straight from the dorsal to the ventral part of the cephalic arc through a minute hole perforating the brain and marking the limit between the protocerebrum and deuterocerebrum (remarked upon by HOLMGREN 1916, p. 144, textfigs. 22 and 23, for *Porcellio,* and by WALKER, l.c., for *Oniscus*); it can be called a. perpendicularis anterior. DELAGE (op. cit., p. 63, pl. 5, fig. 2) described two unpaired arteries as extending from opposite points of the cephalic arc to the dorsal and ventral surfaces of the brain respectively, where they were said to stop and divide into numerous capillaries running along those surfaces. They certainly represent the dorsal and ventral parts of this anterior perpendicular artery, the middle part of which escaped DELAGE's observation owing to the fact that the brain hid this part of the injected vessel.

From the rostral end of the arc two large branches extend along the lobi optici towards the eyes. Near the latter they open into lacunes. I call them aa. optici.

From about the point where the anterior perpendicular artery reaches the ventral portion of the arc, two large aa. communes antennales extend laterad, each dividing into a very small a. antennalis prima, a large a. antennalis secunda, and a large a. facialis. This is in full accordance with DELAGE's description.

As to the other oniscoids nothing of importance can be added to or withdrawn from the picture we have obtained of the aorta in *Ligia* and this holds mainly true of the remaining isopods examined.

By the term aa. laterales I designate the large arteries issuing in pairs from the heart.

It has been demonstrated above how the two vessels accompanying the aorta coincide in structure and position with the lateral arteries. Thus they represent the 1st pair of lateral arteries.

In *Ligia* these vessels lie obliquely ventrally to the aorta; the cross section of the latter is about three times that of one artery (fig. 7). In all of the remaining species examined the arteries lie at the lateral walls of the aorta (thus I have failed to observe such a position as that of the right artery of *Porcellio* in GADZIKIEVICZ's textfig. 2) (fig. 8). Among the latter forms the oniscoids possess large arteries, their cross section averaging 1/2—2/3 of that of the aorta. In the remaining isopods they are, comparatively, very narrow. In *Idothea,* for instance, their cross section is less than 1/10 of that of the aorta, and is thus—as far as my observations go—not at all of the dimensions shown in GADZIKIEVICZ's textfig. 3 (although the possibility of

artificial expansion or shrinkage of these easily influenced structures during fixation must be kept in mind).

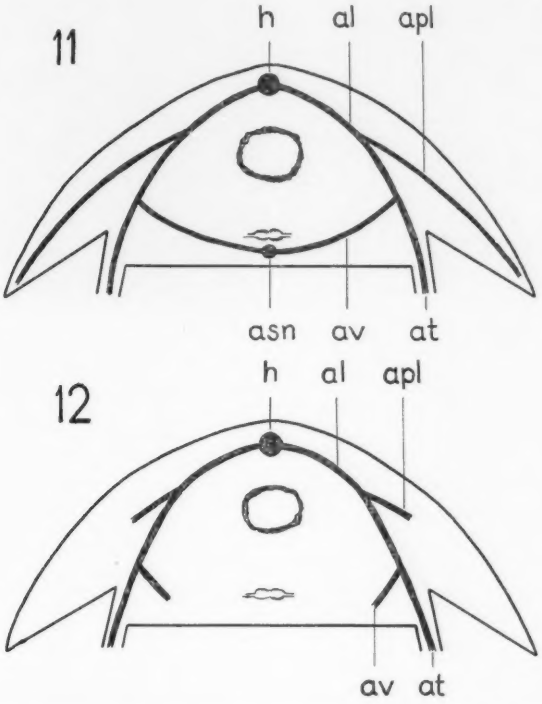
In *Ligia* as well as in other oniscoids this 1st pair of lateral arteries accompanies the aorta without dividing to a little behind the level of the oesophagus (figs. 3, 9, 10). There they diverge from the aorta, still without dividing, and run a short distance rostrolateral into the middle of the agglomerations of muscles dorsal to the optic lobes. Each artery then swells into a sinus, from which several branches extend, repeatedly dividing, among the muscles. No branches reach outside these areas.—It is probably the diverging parts of the 1st arteries that DELAGE described as branches of the aorta under the name of the "artères ophthalmiques".

There are four additional pairs of lateral arteries in *Ligia,* which were already observed by DELAGE (1881, pp. 59 ff., pl. 5). As that author was not aware of the existence of the most anterior pair just described, he numbered them as the 1st—4th pairs, which must consequently be altered to the 2nd—5th.

The arteries now in question issue from the thoracic part of the heart, one pair in each of the four posterior thoracic segments (figs. 3, 11). They leave the pericard along the likewise segmentally arranged alary muscles (p. 36). Each artery of the 2nd pair runs obliquely anteroventrad and gives off one branch in each of the four anterior thoracic segments. The branch sends one branch to the pleura, one towards the ventromedian line, and one to the leg of the same side of the segment. The 3rd, 4th, and 5th arteries supply the corresponding parts of the 5th, 6th, and 7th thoracic segments in the same way as each pair of branches of the 2nd ones. The 4th arteries, moreover, give off branches fusing into a single, median artery running forwards and backwards along the dorsal side of the intestine (a. intestinalis dorsalis). Further, of the 5th pair each artery sends off one a. intestinalis lateralis running backwards along the lateral side of the intestine and one a. abdominalis (figs. 1, 27) that extends backwards, gives off branches to the abdominal pleurae, enters the uropod of the same side and finally, after having bifurcated, the exo- and endopodites of the latter.—The ventromedian branches of the lateral arteries join into the subneural artery, which, however, is not a complete vessel in *Ligia* but interrupted in several places.

One peculiar detail should be added. On a level with the posterodorsal part of the rectum each abdominal artery forms a straight and short but strong branch extending horizontally in the median direction (figs. 3, 13). These branches (aa. proximales) are certainly those described by DELAGE as opening into the dorsal intestinal artery. In fact, they do not reach it but, from each side, open into a space separated from the rest of the body cavity by a septum. Two anterior evaginations meet the arteries in question. From

VOL. 35 1954



Cross sections of thorax with 3rd lateral arteries and their branches projected in one plane, in aquatic isopod or *Ligia* (fig. 11) and terrestrial oniscoid (*Porcellio pictus*) (fig. 12), to demonstrate reduction of pleural and ventral branches as well as total reduction of subneural artery in the latter.

there the space extends along the dorsal and posterior sides of the rectum and encloses the posteroventral lips surrounding the anus. I have sought in vain for any other communications between the cavity and the circulatory system. Thus the blood entering it through the branches of the abdominal arteries seems to have to leave the same way, surprisingly enough. The function of this structure is enigmatic. "Auxiliary hearts" are not rare in the crustaceans. However, regard must be paid to the considerable size of the present organ, the absence of muscles in its walls, and to its situation not very far from the end of the abdominal arteries.

The remaining, true terrestrial oniscoids treated here agree with *Ligia* in certain respects but differ, all of them in the same characteristic way, in several other respects. (Unfortunately, in the small amphibious form *Haplophthalmus* the extremely narrow vessels were too fragmentarily seen in the sections to allow of any certain conclusions concerning its relations to the two types of arterial systems thus indicated to exist in the oniscoids.)

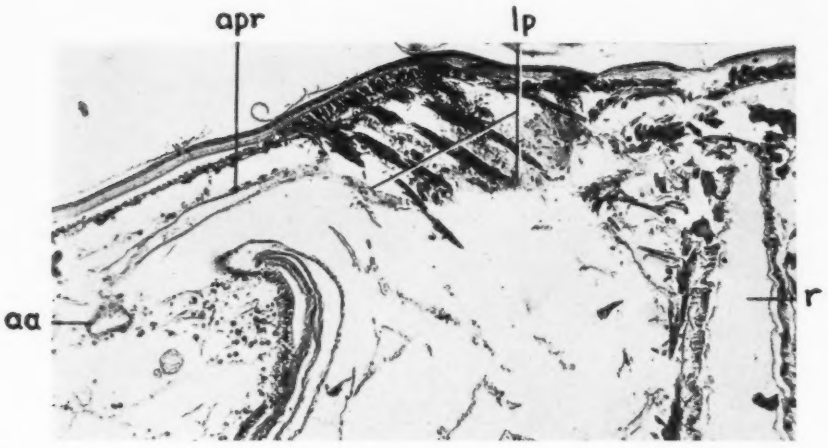


Fig. 13. *Ligia oceanica*. Cross section showing branch (a. proximalis) from abdominal artery to distal end of lacune at rectum. 75 ×.

The same 2nd—5th pairs of lateral arteries issue from the heart in these forms and their extension to the legs is likewise identical.

They each send two branches in the direction towards the pleura and the ventromedian line of the segment respectively. Here the differences begin to appear, however (figs. 11, 12). These branches are very short. The would-be pleural artery reaches the dorsal body wall not far from the lateral pericardial wall of the same side and then stops suddenly, its blood entering a narrow lacune extending further into the real pleura (fig. 14; cf. further p. 38).

The would-be ventromedian branch reaches the ventral body wall about midway between the median line and lateral extremity of the latter and there its blood passes, in the same way, into lacunes. As is natural against this background, there are no traces of even an incomplete subneural artery. In its place a lacune is seen (fig. 15; cf. further p. 28).—WAGNER (1865), when describing the vascular system of *Porcellio*, did not mention the presence of any ventral branches or a subneural artery. DELAGE (op. cit., p. 17) is inclined to consider this omission as the result of an insufficient examination, taking into regard the presence of those structures in all of the aquatic isopods as well as in the comparatively closely related *Ligia* (cf. also ZIMMER 1927, p. 723, fig. 779). As we have now seen the omission is based on real facts concerning the subneural artery but not concerning the ventral branches.

No intestinal branches of the 4th and 5th arteries exist nor any abdominal arteries (fig. 4). WAGNER has not described such structures in *Porcellio*. DELAGE (l.c.) thinks that the lateral abdominal (branchio-pericardial) lacunes described by WAGNER—in a rather peculiar way, it is true—are, in reality,

VOL. 35 1954

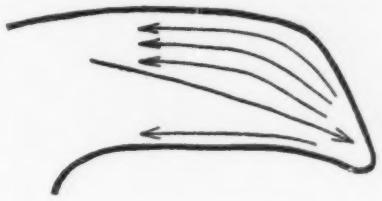


Fig. 14. *Oniscus asellus*. Blood circulation in thoracic pleura in ventral view.

the last branches of the abdominal arteries, a proposition with which we cannot agree in consequence of the above observation.

In fact, there exist no true arteries within the entire abdomen in the present species.

However, in the uropods peculiar vessels are present that coincide closely with arteries in their general appearance (figs. 20, 39). A strong vessel enters the protopodite, bifurcates there, and the two branches thus formed enter the exo- and endopodite respectively. Finally, they open near the ends of those appendages. This is an entirely unexpected feature if we consider the problem of the origin of these vessels in the abdomen, which is devoid of arteries. The pericardial septum separates the large central lacune from the uropods (as to the septa and lacunes cf. fig. 20 and further below pp. 34 ff.). The "uropodal arteries" just described are, in fact, tube-shaped evaginations in the caudal direction of the hindermost part of that septum, which carry blood from the central lacune into the uropods. Considering their function as well as their origin these vessels can appropriately be called the u r o p o d a l p s e u d o a r t e r i e s.

Unexpected though the appearance of these structures is, they are perhaps not altogether unique in the crustaceans. A quite small tube was described by VEHSTEDT (1941, p. 28, textfig. 20) as leading the blood from the general lacune of the limb into the upper lobe of the latter in *Artemia*. Though he did not succeed in obtaining a complete picture of the detailed structure of the organ, so much seems clear that the tube represents an evagination from a septum. An interesting fact is that it is pulsatory. It was not possible to discern how matters are in the pseudoarteries of the oniscoids in this respect but for general reasons the possibility cannot be excluded that they are likewise pulsatory.

In both cases we are obviously dealing with, so to speak, new constructions devoid of any direct phylogenetic importance, which serve to correct a local imperfectness of structure. Thus their appearance at the uropods of the terrestrial oniscoids is certainly connected with the disappearance of the abdominal arteries.

A comparison of the arterial system of *Ligia* with that of the true terrestrial oniscoids gives the general result that the latter hardly differs from the for-

mer in any positive features but distinctly in negative features. It is characterized by reductions which appear in a general shortening of many arteries as well as in the complete disappearance of others. This tendency varies in intensity in different body portions. In the head hardly any reduction can be traced, in the thorax it is seen in the shortening of many arteries and the total reduction of the subneural artery already incomplete in *Ligia;* in the abdomen the reduction is complete. The missing artery portions are replaced by lacunes; as we shall see below this is not such a truism as it might possibly seem at first. In one case the substitution is a particularly peculiar formation, the uropodal pseudoarteries replacing the posterior parts of the missing abdominal arteries.

DELAGE's descriptions of the arterial systems of the remaining groups of isopods seem to be, largely, correct and the types not examined by him, the Valvifera and Asellota, do not reveal any new facts of special interest that have not already been reported above.

One doubtful point already touched upon above, has to be considered more closely here, viz. the tripartition of the dorsoanterior blood course from the heart found in all the forms examined except *Asellus.* It was stated that in the oniscoids the two vessels accompanying the aorta represent a pair of lateral arteries in addition to the four pairs previously known in them.

GADZIKIEVICZ, who only examined the posterior parts of the vessels in question, thought that they corresponded, in *Gnathia* and *Anilocra,* to the vessels described by DELAGE (1881, pl. 1 fig. 1 and pl. 6 fig. 2) as extending parallelly and rather near to the aorta. However, it can already be seen from those figures that the latter vessels each divide into four and three branches in *Anilocra* and *Gnathia* respectively, extending into the anterior four or three thoracic limbs, etc. (in *Gnathia* the number of thoracic segments and limbs is reduced). This fact indicates that these vessels are the equivalents of the vessels in the oniscoids treated above under the name of the 2nd lateral arteries, a conclusion that is definitely confirmed by the present author's observation that vessels described by GADZIKIEVICZ as situated intimately close to the aorta are present also in these forms beside those described by DELAGE.

Thus there is, fundamentally, full agreement as to the extension of the aorta and the anterior pairs of lateral arteries in all the isopods examined in this respect except *Asellus* (fig. 2).

The correspondence in extension of the anteriormost lateral arteries of *Asellus* with the 2nd lateral arteries in the remaining isopods leads to the likely interpretation that the 1st lateral arteries are, simply, absent in that form.

A definite difference in respect of the lateral arteries between the oniscoids and the remaining isopods (disregarding certain aberrant parasitic types) is

VOL. 35 1954

evident in the abdomen (fig. 2). In the latter there exists an additional, independent pair of lateral arteries — called the abdominal arteries by DELAGE — supplying the abdomen in about the same way as do in *Ligia* the branches of the arteries of the last thoracic segment called by the same name.

All in all, we can conclude that in the oniscoids there are five pairs of lateral arteries, and in the remaining isopods except *Asellus* (and disregarding transformed parasites) six pairs.

A curious phenomenon is that the 5th pair of lateral arteries in *Ligia* has, so to speak, taken over many branches from the 6th pair existing in the aquatic forms. However, although similar, the extension of the branches is not identical in the respective cases. We will return to this problem.

The absence of the 6th pair of lateral arteries in the oniscoids is already significant of the general tendency for the arterial system to be considerably restricted in them in comparison with the aquatic isopod groups. This can be observed from other parts of the system as well. The latter forms possess a mostly complete subneural artery taking its origin from the oesophageal circle and contributed to by the ventromedian branches of the lateral arteries. Above all, it is seen that the vessels extend much further into the pleurae, the limbs, etc., here. This is valid even in comparison with *Ligia*. We have demonstrated above that the vessel system of *Ligia* is much more complete than that of the true terrestrial isopods. In fact, the position held in this respect by the latter in relation to *Ligia*, is held by *Ligia* in relation to the aquatic groups.

In this connection, however, the reservation must be made that the pictures of the vessel system given by the older authors cannot be relied upon fully concerning the extension of the system. There the large vessels appear as branching and branching into smaller vessels forming veritable capillary nets. In the aquatic isopods and, to some degree, in *Ligia* there exist, in reality, rather thin vessels, it is true, but their extension has been considerably exaggerated as revealed by the sections. The explanation is obvious. With the method earlier exclusively used, the injection of colour fluids, it is naturally only possible to trace the blood courses. With it one cannot distinguish courses possessing walls of their own from lacunes. The majority of the spaces that have been called capillaries are, in fact, lacunes.

Nevertheless, concerning the system of arteries we get a type series from forms with a well-developed system — represented by the aquatic isopods — via such with a less complete system — represented by the amphibious *Ligia* and possibly other ligiids and trichoniscids — to such with an even less complete system — represented by the fully terrestrial oniscoids (cf. figs. 2—4 and 11—12).

4. LACUNES OF BODY IN GENERAL.

When leaving the settled system of blood vessels and turning to the lacunes, we may at first get the feeling of passing from order into disorder. However, we shall see that this is never wholly true and concerning the oniscoids far from true.

It can be generally stated that the blood, when leaving the ends of the arteries, arrives in systems of narrow lacunes. The further direction of the blood in head and thorax follows two rules: it flows towards the centre of the body and backwards towards the abdomen. During its course it collects into larger lacunes, finally arriving, all of it, in one single lacune, the pericardial sinus.

Exceptions from this latter rule are found in two places where large lacunes split up into smaller ones in connection with a particularly lively exchange of chemical matter between the blood and its surroundings. These places are the excretory and respiratory organs. However, the lacunar capillaries unite again into larger lacunes after these complications. These lacunar nets can be compared with portal systems.

The lacunes are, simply, interspaces between tissue bodies and organs or else they are delimited by septa. Two rules can be discerned concerning these two possibilities. The former condition is prevalent in the aquatic isopods, the latter in the terrestrial ones. From another point of view we can state that septa occur, at least, in part of the abdomen as well as in the legs, that they then appear in wider parts of the abdomen and, lastly, in the thorax and head.

VOL.
35
1954

As to the blood supply of the lacunes of head and thorax it follows from the above description of the system of arteries that three sources have to be taken into consideration: (1) the blood having followed the aorta in the entire extension of the latter to the oesophageal circle, (2) the blood leaving the branches of the aorta as well as the 1st lateral arteries in the head, (3) the blood leaving the remaining lateral arteries in the thorax.

In all the oniscoids the cephalic arc of the aorta passes into the circumoesophageal vessel and then into a short ventral vessel pointing posteriad. From there the blood arrives in a narrow space below the nerve cord, where it is carried in the posterior direction. As was stated above this space consists in *Ligia* of, so to speak, a fragmentary vessel. From branches of the 2nd—5th lateral arteries short horizontal branches extend below the cord. Fat tissue and the cord delimit, though not completely, the interspaces between those branches and thus a continuous blood space is formed. In the remaining oniscoids the vessel fragments are wholly absent and the blood space in question is represented by a lacune exclusively, completely closed in, as it seems, by fat tissue and the cord (fig. 15). It can be called the s u b n e u r a l l a c u n e.

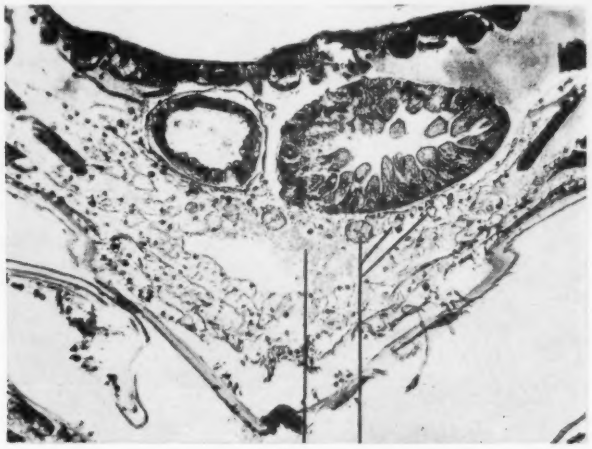


Fig. 15. *Oniscus asellus*. Cross section of last thoracic segment: subneural lacune. 75 ×.

By these arrangements the nerve cord is obviously provided with arterial blood arriving directly from the heart, in *Ligia* via the aorta as well as the 2nd—5th lateral arteries, in the remaining oniscoids via the aorta exclusively.

The blood leaving the aorta branches and the 1st lateral arteries arrives in a system of lacunes in the head—in *Ligia* delimited by fat tissue bodies and various organs (fig. 32), in other oniscoids partly by septa. From there it runs in each side of the oesophagus backwards.

On a level with the oesophagus the blood has to pass special lacunar systems round the maxillary glands occupying the space between oesophagus wall and body wall in both sides.

Previous authors have stated in a general way that there is a lively blood circulation round the maxillary glands. Thus BURIAN & MUTH (1924, p. 639) say: "Auch die Blutversorgung des cölomatischen Drüsenteiles wird bei den Iso-, Schizo- und Amphipoden noch in der ursprünglichen Art und Weise" (i.e., as in the "entomostracan" crustaceans) "bewirkt: durch Lakunen also, die vorwiegend zwischen Cölomsackwand und Integument ihren Platz haben." It is true, as is evident from the above description, that the blood is not carried to the organ by real vessels as in the decapods but through lacunes. However, the circulation round the organ takes place in a quite regular system of lacunes in all the oniscoids treated here and offers a picture wholly differing from the statement quoted.

The conditions in *Oniscus* may serve as an example. The coelomic sac is ventrally attached to an apodem and its remaining sides are closely surrounded by parts of the duct (figs. 16—18). From the head the blood arrives at the dorsolateral corner of the anterior part of the coelomic sac (fig. 16). Here

it enters a layer of narrow lacunes — separated from each other by thin septa —that wholly enclose the sac, thus extending between, on the one hand, the wall of the sac, on the other the above-mentioned apodem as well as the duct. This system of lacunes opens into large ventral lacunes in two places. Through an opening at the ventromedian end of the central part of the coelomic sac, at least part of the blood passes into the subneural lacune (fig. 17). At the ventromedian corner of the proximal end of the sac the lacunes round it fuse finally into a lacune extending ventrad in the maxilla along the distal part of the duct (fig. 18). From there the blood is carried to the large central lacune surrounding the intestine and mid-gut coeca. Part of the blood leaving through the anterior opening seems also to arrive here.

The outer sides of the parts of the duct surrounding the coelomic sac are intimately enclosed by fat tissue in almost their whole extension or are attached to the hypodermis (figs. 16—18). Only the small laterally directed part of its wall in the vicinity of the entrance of the dorsal lacune is in direct contact with the blood of that lacune, i.e. a lacune not directly belonging to the "interior system". Thus the duct gets its main supply of blood from the same system as the coelomic sac and they form a unit in this respect. It seems significant, in this connection, that the lacunes extending between the coelomic sac and the duct are distinctly wider than those situated between the former and the ventral apodem.

The blood circulation in the maxillary gland of the oniscoids thus takes place in, fundamentally, the same way as in the decapods with a branching coelomic sac (Brachyura, Anomura, certain Macrura; MARCHAL 1891, 1892, etc.) if we disregard the way in which the blood is carried to the organ.

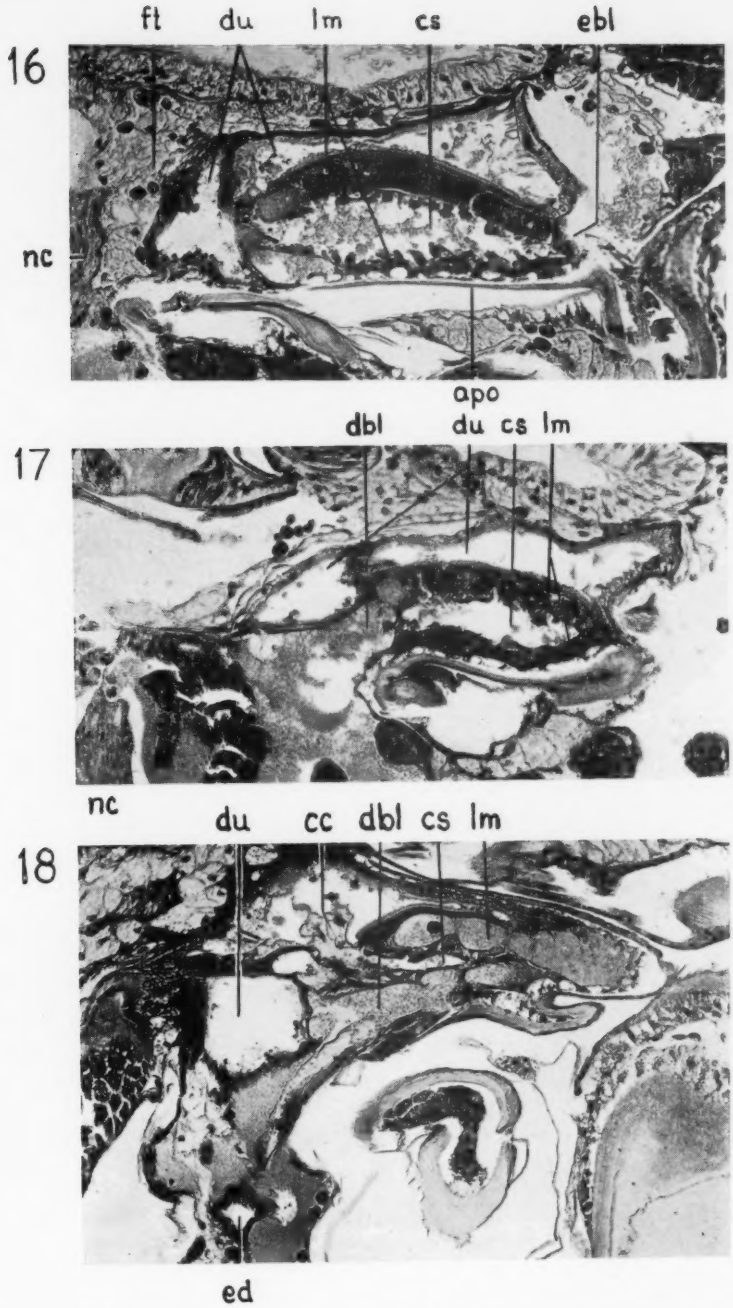
As to the blood carried by the 2nd—5th lateral arteries it can be briefly stated that it arrives in the central lacune, in the oniscoids. However, there are three exceptions.

Two of them have reference to *Ligia* only. That some blood is delivered into the subneural blood space there, was noted above. Further, the blood carried by the abdominal branches reaches the central lacune, it is true, but only the abdominal portion of the latter, of course.

The third, important exception is formed, in all the oniscoids, by the blood entering the thoracopods. It returns via lacunes in the legs and, having arrived in the body again, is collected into two separate, comparatively narrow lacunes running in each side along a line extending along and close medially to the bases of the thoracopods. In a living animal examined from its ventral side the lively blood movement in these ventrolateral lacunes (as well as the slower one in the central lacune) is easily observable.

The blood of the head and thorax is thus finally collected into four departing currents, the central lacune, the two ventrolateral lacunes, and the subneural lacune (in *Ligia* with intercalated vessel fragments) (fig. 19). In *Ligia* the

VOL. 35 1954



Oniscus asellus. Lacunar system of maxillary gland. Cross sections. 160×. Fig. 16. Entrance of blood into lacunar system round end sac.—Fig. 17. Anterior departure of blood. —Fig. 18. Posterior departure of blood.

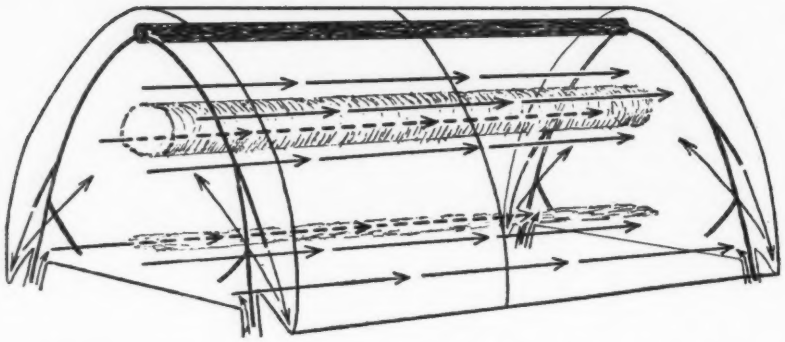


Fig. 19. Diagram of main blood currents in posterior half of 5th and anterior half of 6th thoracic segments in terrestrial oniscoid (*Porcellio pictus*). Heart, 3rd and 4th lateral arteries with pleural, ventral, and thoracopodal branches. Pleural afferent and efferent lacunes, thoracopodal lacunes, central lacune, subneural lacune, and ventrolateral lacunes. Heart and vessels drawn dark, lacunes designated with pointers. Position of gut and nerve cord indicated.

limits between these spaces are formed by bodies of fat tissue and organs; the walls are incomplete in many places so that it can well be imagined that blood can pass from one space into another though probably in small quantities only. In the terrestrial forms the walls are far more complete and consist partly in septa, as seen especially in the lateral parts of the central lacune.

At a short distance proximally to the posterior end of the mass constituted by the fused 8th thoracic and six abdominal ganglia (thus approximately at the border between thorax and abdomen) the subneural lacune and the ventrolateral lacunes fuse into one median lacune and can be called the v e n t r a l a b d o m i n a l l a c u n e. The number of the lacunes entering the abdomen is thus restricted to two, that just mentioned and the central lacune.

Diagrammatically, four main blood spaces can be discerned in the abdomen, (1) the ventral abdominal lacune, (2) the central lacune, (3) a dorsal space round the heart, and (4) a number of lateral sinuses (cf. fig. 20). The first two of these spaces we recognize from the thorax. However, it will be most practical to treat the pericard first.

Dohrn (1870 a, p. 67) is the first author to mention the pericard in the isopods. He describes it briefly as "einen aus Bindegewebe — — — bestehenden offnen Sack, der das Herz einschliesst". With this description he certainly means the bodies of fat tissue that extend along the heart but w i t h i n the pericard as the latter is described below.

Delage (1881, p. 87) states for the isopods in general that the pericard "n'est pas en général formé par une membrane isolée. Il est comme sculpté dans les parties musculaires qui remplissent l'abdomen et par conséquent n'est

VOL. 35 1954

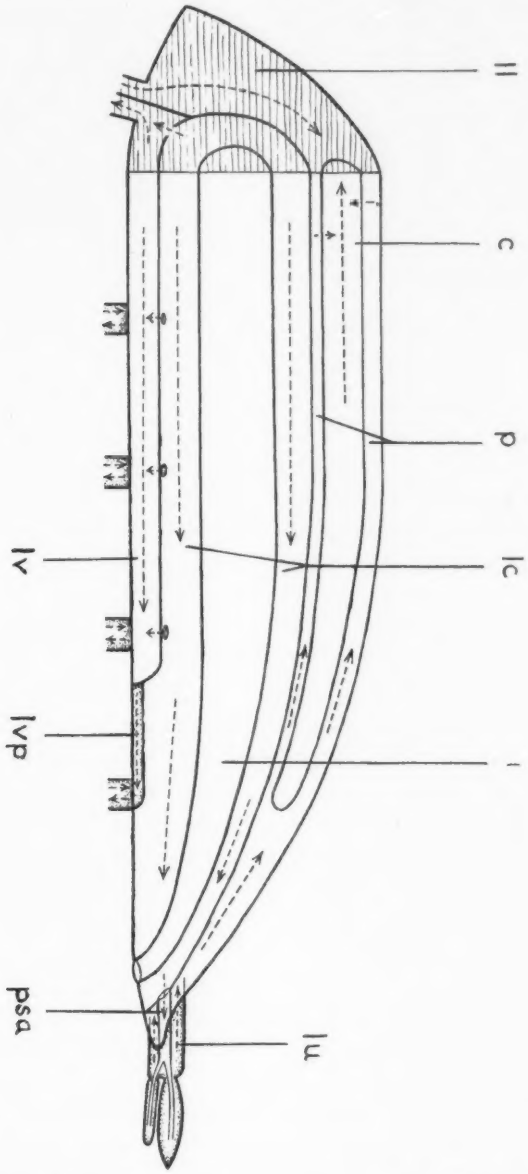


Fig. 20. Diagram of abdominal lacunes in terrestrial oniscoid (*Porcellio pictus*). Entrance of blood into heart and from central into ventral lacune at attachments of pleopods indicated by short pointers.

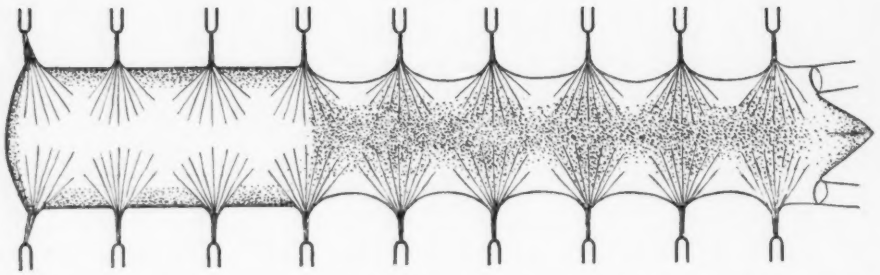


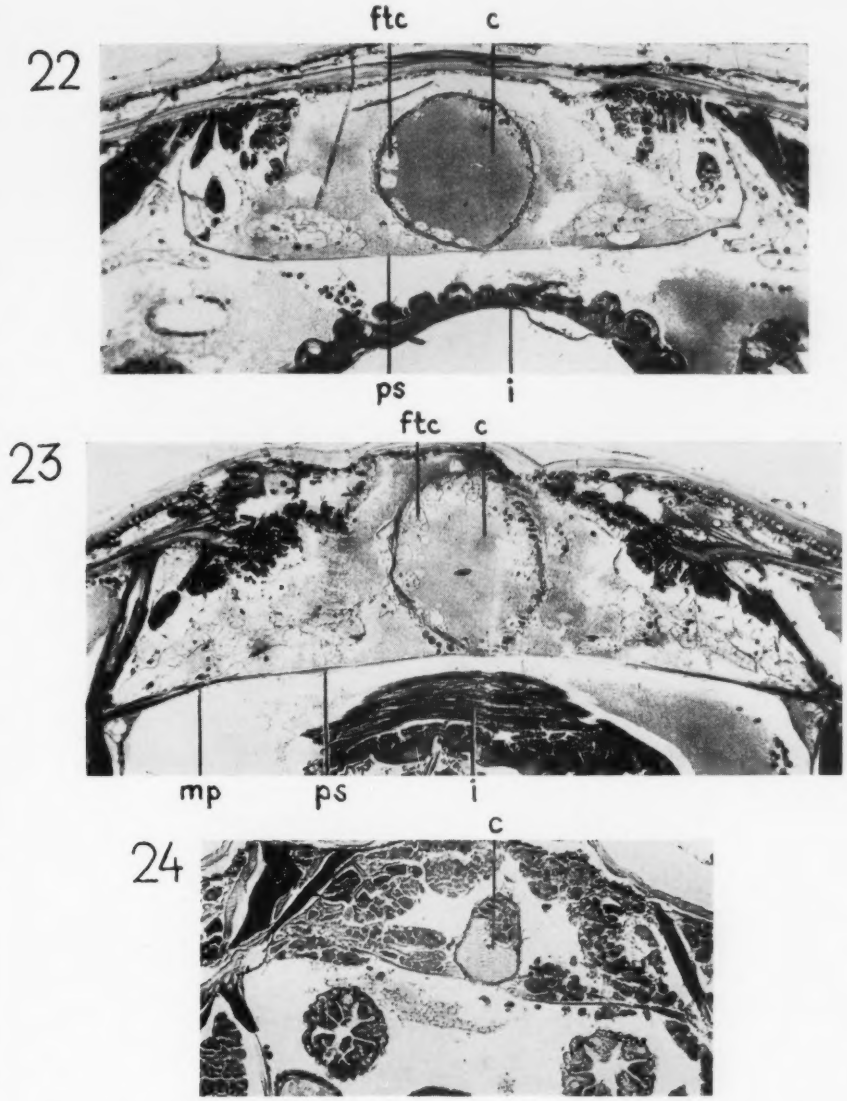
Fig. 21. Diagrammatic picture of pericardial septum in *Oniscus asellus*. Three posterior thoracic segments to the left, abdominal portion to the right. Real mutual sizes of segments not taken into regard.

susceptible d'aucune variation du volume". The possible exception would apparently be *Gnathia,* where he observed (op. cit., p. 70) "une membrane très mince". The pericard was stated to contain oxydized blood. About the pericard of *Ligia* the only remark made was that it "n'offre rien de spécial dans sa constitution" and thus would agree with what DELAGE stated to be generally valid in the isopods.—This description of the pericardial structure has not been contradicted, cf. GERSTAECKER & ORTMANN (1901, p. 78) and BRÜCKE (1923, p. 913). Only BRUNTZ (1907) cursorily used the term pericardial septum when describing the position of the lymphocytogenous organs.

VOL. 35 1954

In opposition to these propositions the present author can most positively state that there is a well-developed pericardial septum provided with muscles of its own (mm. alares) in all the oniscoids examined.

The conditions in *Ligia* are chosen as the basis for the description. There the pericardial septum extends from the 5th abdominal to the 4th thoracic segment (cf. figs. 21—24). Its posterior part is attached only along its lateral margins to the dorsal body wall, in both sides about midway between the median line and the lateral extremities of the body. Thus its posterior margin is free and there is a wide opening between it and the dorsal body wall, an opening through which the blood arrives from the posterior body part (cf. further below). In the intersegmental zones of the abdomen the septum is attached to the dorsal body wall in the way just described, forming in these places a closed flat cup round a dorsal space with the heart in its centre (cf. fig. 86). In the middle of each of the five anterior abdominal segments the dorsolateral parts of the septum are absent and the lateral margins of its horizontal part pass into the lateral septa of the abdomen (cf. below) without discernible limits (figs. 1, 26, 27, 40). In this way the lateral lacunes leading from the respiratory organs deliver the oxydized blood into the pericard through five pairs of large openings (cf. figs. 20, 21). Within the thorax the septum forms a wholly unbroken wall round the pericard with the exception that the arteries perforate it.



Pericard. Cross sections. Fig. 22. *Oniscus asellus*. Pericard in anterior part of abdominal segment. 75 ×.—Fig. 23. The same. Pericard and alary muscles in abdominal intersegment. 75 ×.—Fig. 24. *Haplophthalmus danicus*. Pericard and alary muscles at border between 6th and 7th thoracic segments. 160 ×.

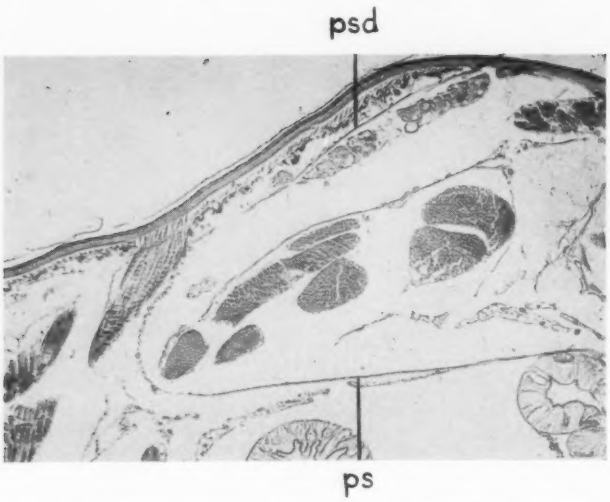


Fig. 25. *Ligia oceanica*. Lateral portion of pericard in thoracic segment. Its wall seemingly complete in dorsal side too. Cross section. 90 ×.

Near the middle of the intersegmental zones the septum appears to be continuous also on the dorsal side of the heart, a distinct membrane—below the dorsal hypodermis and the pigment cells and other mesodermal cells below the latter—connecting its dorsolateral margins (fig. 25). The problem has been much discussed as to whether the pericard (when present) is closed on the dorsal side of the heart too or not, in the decapods examined in this respect (cf. WETTSTEIN 1915, p. 10; this author maintains the latter opinion). The present fact might seem to speak in favour of the former being the case in *Ligia*. However, the dorsal parts differ distinctly in structure from the ventrolateral parts of the pericardial septum. They are composed of connective threads of the type that attach septa in general to the hypodermis, threads that in the case now in question have been united into broad ribbons of an unusually wide extension.

The muscles of the pericardial septum are striated and symmetrically arranged in nine pairs situated in the intersegments between the 4th thoracic and 6th abdominal segment (cf. fig. 21). Each muscle starts as a thick bundle of fibres attached to the interiormost, dorsolateral corner of the cuticle fold below the overhanging pleura (figs. 23, 24). From there it extends, at right angles to the longitudinal axis of the body, in the horizontal plane straight in the median direction (cf. also figs. 37, 38). Arrived at the ventrolateral margin of the pericardial septum it is continued by elastic threads, which extend along the ventral surface of the septum, diverge like a fan, and reach nearly to the median line of the septum, where they almost meet their partners from the opposite side.

VOL.
35
1954

In the thorax the lateral arteries when leaving the pericard extend close along the alary muscles.

In the remaining oniscoids the pericard is of the same main structure. An exception of a certain importance is that the pericardial septum extends considerably further posteriad in them, reaching to behind the level of the anus. There it is laterally fixed to the body wall below the bases of the uropods, the lacunes within the latter—except the pseudoarteries, of course—representing the beginning of the pericard (figs. 20, 21, 39). Medially—between the uropods—it continues further backwards (fig. 39) and is finally attached to the ventral wall of the pointed part of the unit formed by the fusion of the 6th abdominal segment and the telson. The lumen of the part is thus enclosed in the pericard.—Further, it is to be noted that there exist no dorsal continuations of the septum by connective ribbons as in *Ligia*. The alary muscles are even stronger in the true terrestrial forms than in *Ligia* and *Haplophthalmus*.

The conditions met with in the aquatic isopod groups do not differ in any important respects. It can be noted that the alary muscles though distinct are considerably weaker here.

It is striking to find how greatly this pericardial septum with its muscles resembles the dorsal diaphragm and its alary muscles in the eutracheates (cf. BETHE 1926, WEBER 1949, etc.). Among the crustaceans conditions have earlier been described in the decapods that show some slight similitude to those now related in so far as BROCCHI (1875), DOGIEL (1877), NUSBAUM (1899), etc., described single muscle fibres in the pericardial septum of members of this group. Those observations were doubted by some authors (cf. GERSTAECKER & ORTMANN 1901, p. 1012) but accepted by others (cf. WETTSTEIN 1915, and BRÜCKE 1923, pp. 905, 907). HAFFNER (1933 and 1934) and KLÖVEKORN (1934) found a pericardial septum of very similar structure to that reported here for the isopods, in *Phronima* and *Gammarus*, members of the likewise peracaridan amphipods, and described it carefully. The present author has observed a well developed pericardial septum with very short alary muscles in *Apseudes spinosus* M. Sars (Tanaidacea). In the remaining crustaceans pericardial muscles are unknown, in certain cases definitely stated to be absent (cf. VEHSTEDT 1941).

As to the function of the pericardial muscles the opinions have diverged considerably, regarding the eutracheates as well as the crustaceans. This is mainly due to the difficulties of making direct and exact observations on the septum in the living animal. We shall not here examine the tangled mass of more of less motivated attempts to solve the problem but shall confine ourselves to considering, briefly, the in many ways attractive explanation proposed by KLÖVEKORN (1934, p. 190) for *Gammarus*, inasmuch as the relations of this type to the isopods are comparatively close. His main point is, diagrammatically, that the "dauernde Spannung" of the alary muscles prevents the septum from

rising during the systole but keeps it flat so that only its median portion partakes to some degree in the movements of the heart. Consequently, the volume would diminish only slightly during the systole, which of course is of importance for maintaining the blood flow to the sinus.

One might suspect that this account needs to be modified in one or two respects.

The assumption that the alary muscles are continuously contracted can hardly be accepted considering the fact that they are striated; one would rather accept the proposition made by other authors that they contract during the systole and relax during the diastole.

Further, it seems possible that the assumption that the volume of the sinus diminishes but little during the systole, represents an understatement. In fact, it seems to increase considerably at that moment, which of course must have a stimulating effect on the blood currents leading to it exactly at the moment when such an effect is, on theoretical grounds, desirable for the swift filling of the sinus.

Two phenomena are of interest in this connection.

The pleurae of the oniscoids are occupied by strands of fat tissue leaving a seemingly irregular network of interspaces between them. As they are quite thin the movement of the blood is easily observed in a preparation microscope if they are examined from their ventral sides, where the chromatophores are comparatively sparse. In *Ligia* such a lacunar network is fed by a branch of a lateral artery. In the other oniscoids the corresponding branch does not reach the pleura. Here it is seen (fig. 14) that a rapid current invariably moves from a point near the anterior margin of the base of the pleura diagonally to the lateroposterior point of the latter, a course represented by one afferent lacune. In both cases the blood returns slowly along two diffuse courses parallel to the anterior and posterior margins of the pleura, courses represented by the net of lacunar capillaries.

A similar network of lacunar capillaries open to observation in the living animal is found in each branch of the respiratory pleopods. It is especially intricate in the limbs containing air breathing organs (cf. further below Chap. 5). Here it is a striking fact that the velocity of the blood is distinctly higher in the lacunar network than in the lacunes carrying the blood to the pleopods.

The former case is easily explained. As the blood arrives in the pleura almost directly from the heart it is only natural that its velocity in the afferent lacune or vessel is high and that it d e c r e a s e s swiftly when the blood arrives in the net of capillaries, the total cross section of which considerably surpasses that of the afferent lacune or vessel. As the capillary net of a pleopod offers an, at least seemingly, corresponding morphological picture, it is rather surprising that the velocity of the blood i n c r e a s e s in the capillary net.

VOL.
35
1954

The blood is carried directly from the pleopods to the pericard (via the lateral lacunes, cf. below). Can it be that the special structure of the pericardial septum makes the pericard exert a s u c k i n g effect on the blood under its immediate influence, possibly in the entire abdomen?

Taking for granted the thesis that the alary muscles are of considerable importance for the blood movement—whatever the way in which this influence may be exercised—their unusual strength in the oniscoids and above all in the truly terrestrial forms, is worthy of note.

In *Ligia* and other oniscoids except *Haplophthalmus* the lateral parts of the body cavity of the five anterior abdominal segments are separated by lateral septa extending from the dorsal cuticle down into the protopodites of the pleopods, which latter are thus divided into two (figs. 20, 26). The anterior and posterior margins of the septum are attached to the body wall. Thus one pair of separate lateral chambers, the l a t e r a l l a c u n e s, are formed in each segment. In the middle of the segments the septa are continuous with the pericardial septum and the lacunes consequently open into the pericard. The extreme lateral parts of the chambers are occupied by strands of fat tissue with scattered gland cells. The attachment of the septa takes place by means of elongated epithelial cells (fig. 27) of the same type as the "pillar cells" of the pleopods (figs. 1, 26) and the outermost, thin parts of the pleurae.

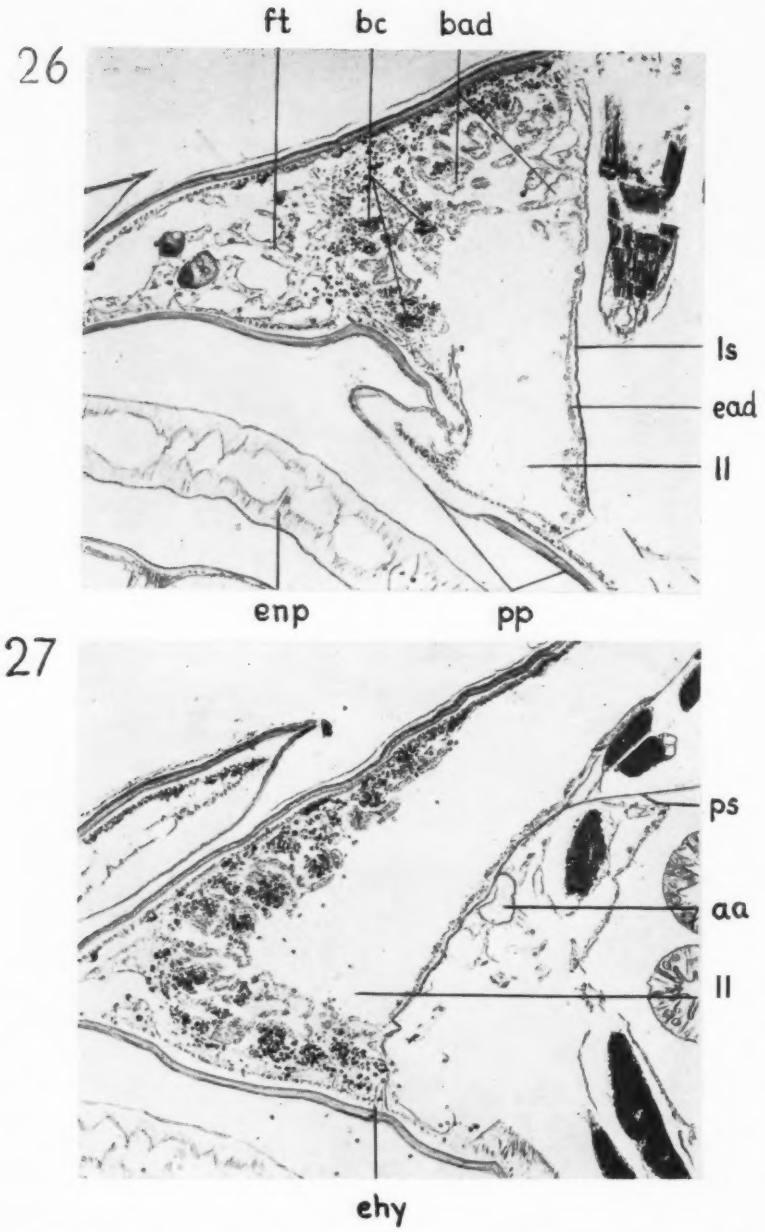
In *Haplophthalmus* the extremely thin lateral septa extend continuously through all of the five anterior abdominal segments. Consequently, there is in each side only one, very broad lateral lacune.

The lateral lacunes carry the blood from the pleopods (respiratory organs) to the pericard.

In this connection attention will be drawn to the peculiar structure of the walls of the lateral lacunes. However, only a brief survey of the complicated conditions will be given here.

When dealing with the reproductive and excretory organs of the oniscoids Nemec (1896, pp. 27—28, 48—49, textfig. 7, pl. 3, figs. 48—50) found in this group (*Ligidium* and *Porcellio* are mentioned) certain structures in the abdomen which he described as excretory organs. According to him they consist of irregularly branching tubes extending in each lateral lacune of the three anterior abdominal segments down to a single mouth on the inner side of the base of the limb corresponding to the lacune. In Nemec's opinion the tissue represents a syncytium. Its cytoplasm is granulated. The lumen "erscheint nicht immer scharf abgegrenzt". Nemec did not find these structures in *Asellus*.

Martynow (1896), Koulwietz (1899), Bruntz (1903), Ter-Poghossian (1909, p. 28), and Burian & Muth (1924, pp. 674 ff.) have also dealt with



Ligia occanica. Lateral lacune, opening into pleopodal protopodite (fig. 26) and into pericard (fig. 27). "Depuratory" tissue is seen. Cross sections. 90 ×.

VOL. 35 1954

the formations in question but only cursorily and without altering or adding to the picture given by NEMEC. They found them in several other isopods as well.

These structures are present in all the oniscoids and other isopods (including *Asellus*) treated here.

It is quite clear that they do not form real organs in the sense used by NEMEC. After the most careful examination I can quite positively state that no exit ducts exist.

In fact, we are here dealing with a one-layered endothelium of a special cytological type covering the lateral septum on the side turned to the lumen of the corresponding lacune (figs. 26—31). In most oniscoids there are consequently five pairs of areas covered by this tissue (no difference between the anterior and posterior lateral lacunes of the abdomen exists, in reality), and in *Haplophthalmus* only one, very long area in each side.

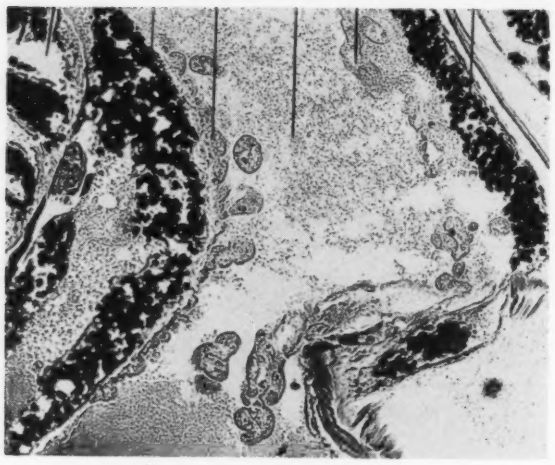
In most forms the tissue extends from the protopodites of the pleopods up to the pericard. From a narrow zone along the margins of such an area slender processes extend laterad (figs. 26—28, 30). Their distal ends branch and form cupshaped bodies with their openings turned f r o m the lumen of the lacune (fig. 27). These bodies lie close together and form a thick, irregular, discontinuous layer on the l a t e r a l side of the lacune. Blood cells are particularly numerous in the canals of this layer, often forming dense masses. Single, short branches extend into the protopodites as well.

BRUNTZ considered the tissue to consist of a separate layer in each side of the lacune and there are, consequently, reasons for stressing the fact appearing from the above description that there is, fundamentally, only one layer situated on the median side of the lacune and that the lateral "layer" is formed by processes or folds from the former. However, in *Idothea* the tissue really surrounds the whole of the lumina of the lateral lacunes, a phenomenon connected with the fact that the lateral lacunes are closed in by the septum from all sides in that form.

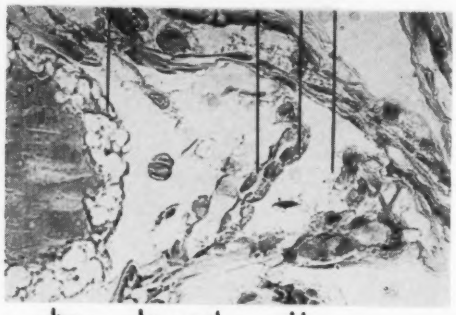
In *Cylisticus* (fig. 30) the extension of the tissue is more restricted and even more so in *Haplophthalmus* (fig. 31). In the former the few and clumsy processes do not form a lateral layer, in the latter there are no processes at all and, consequently, no lateral layer.

No cell walls can be discerned; this is in accordance with NEMEC's but contrary to BRUNTZ's statement. The cytoplasm is densely and finely granulated, giving a characteristic appearance to the tissue. The nuclei are small, spherical or somewhat oblong. They are situated at about the level where the comparatively dense inner portion of the cytoplasm begins to become gradually looser in the direction towards the lumen of the lacune. Fat drops are absent. In the interior of the cytoplasm spherical or angular, homogeneous bodies

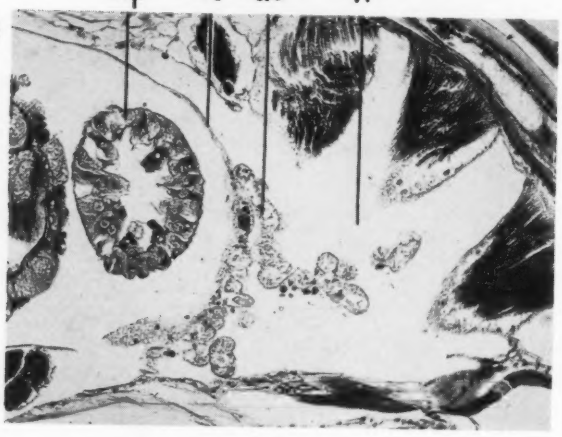
28



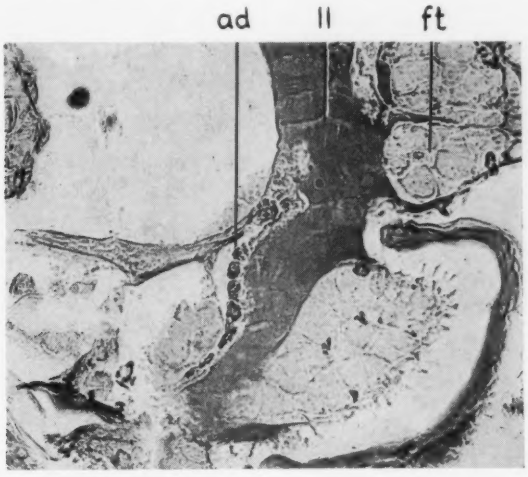
29



30



VOL.
35
1954



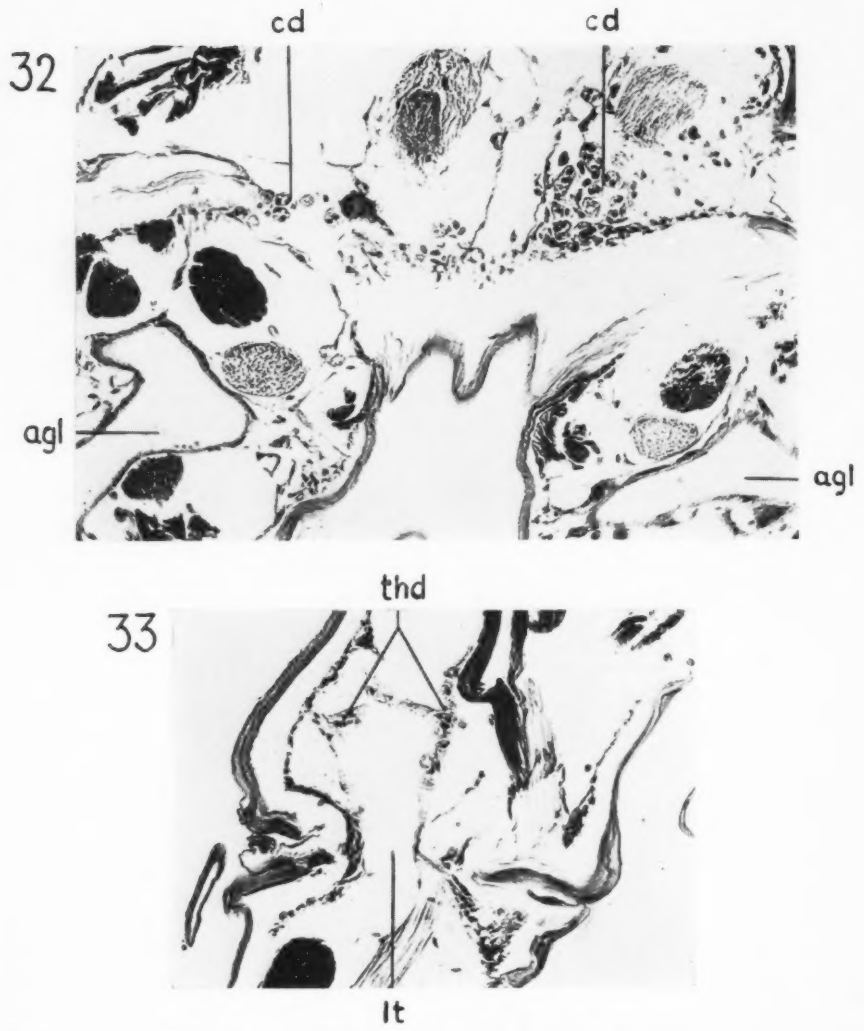
"Depuratory" tissue along lateral lacunes of abdomen. Cross sections. Fig. 28. *Porcellio pictus*. Fix. Flemming's strong fluid. 160 ×.—Fig. 29. *Porcellio scaber*, from marsupium, 1st larval stage. 320 ×.—Fig. 30. *Cylisticus convexus*. 160 ×.—Fig. 31. *Haplophthalmus danicus*. 320 ×.

appear in all species, being larger the deeper they are situated. In *Cylisticus* and *Haplophthalmus* they are particularly large.

Owing to its cytology, property of storing injected carmine grains, and situation along the branchio-pericardial lacunes, this tissue has been claimed to possess a depuratory function. Further researches are necessary to prove this assumption.

A similar tissue is present in certain places along the blood currents in the thorax or abdomen of different malacostracan groups (cf. the survey of BURIAN & MUTH, pp. 674 ff.). It is of special interest that in the amphipods it is found along the ventral parts of the lacunes leading from the thoracopods and pleopods (as well as in the head) (DELLA VALLE 1889 and 1893, KOULWIETZ 1899, BRUNTZ 1903; researches by the present author on *Gammarus*, figs. 32, 33). Similar conditions are seen in *Apseudes spinosus* M. Sars (Tanaidacea).

In this connection attention will be drawn to the fact that in the head of the isopods are situated bodies offering a cytological picture so exactly identical with the tissue just treated that even the variations characteristic of the different species are found there (figs. 35—37). One body is situated in each of the two large lateral lacunes of the head, above and behind the antennae, extending from near the lateral wall of the head obliquely backwards-upwards. The lateral branch of n. tegumentarius passes close by. An exit duct is lacking. These bodies cursorily observed and described as vestigial antennal glands by NEMEC (1896, pp. 15 and 46) and some other authors might be called

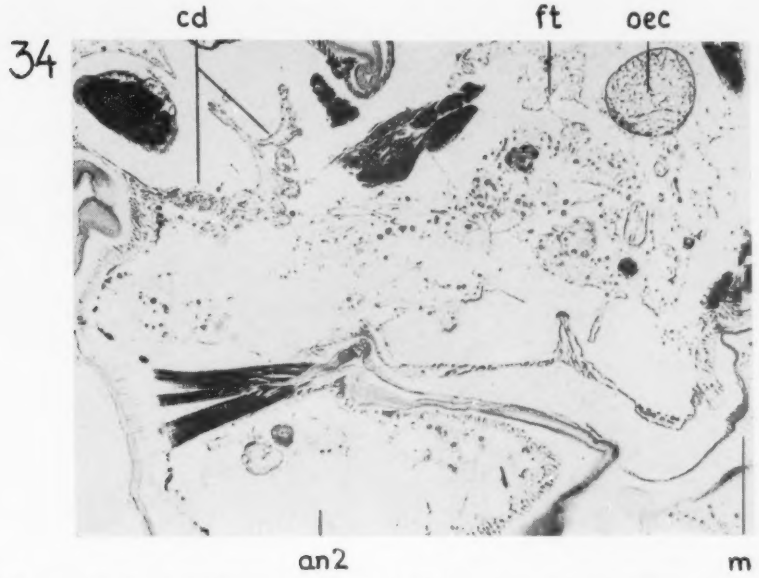


Gammarus sp. 160 ×. Fig. 32. Cephalic "depuratory" tissue between bases of antennae. Ducts of antennal glands seen. Cross section.—Fig. 33. Departing lacune in thoracopod, with "depuratory" tissue. Longitudinal section.

NEMEC's organs. They are to be kept strictly apart from "TER-POGHOSSIAN's organs" situated in the same area, which have given rise to much confusion.

Within the remaining centroventral cavity of the abdomen, i.a. enclosing the intestine and the mid-gut coeca, there are no septa in *Ligia*. Nevertheless, a subdivision of the cavity has taken place to a certain extent (fig. 1). A large

VOL. 35 1954

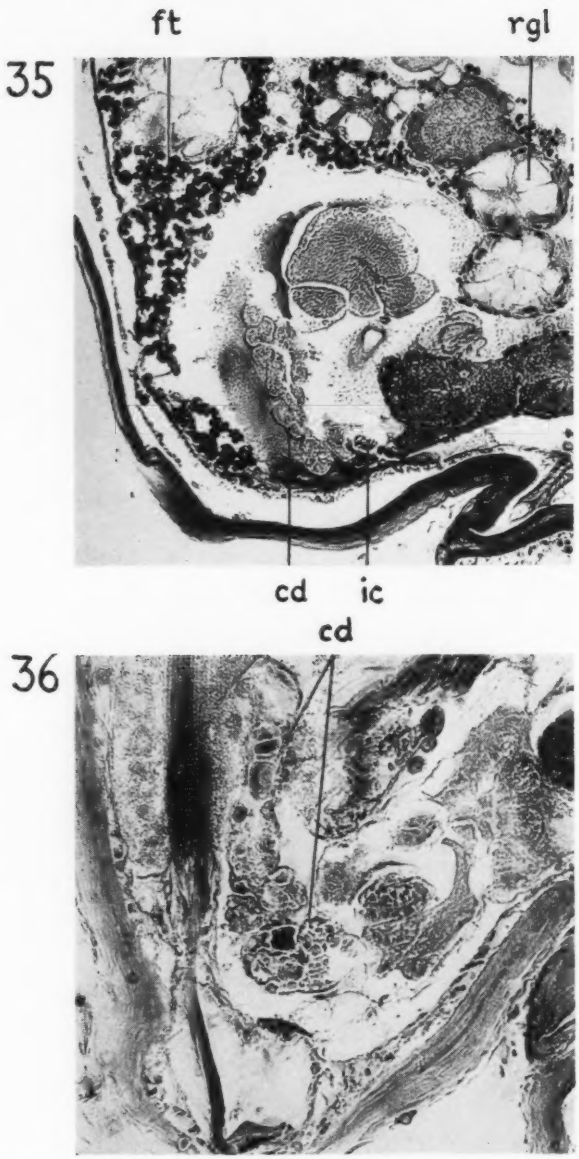


Ligia occanica. Cross section to show general position of cephalic "depuratory" tissue. 90 ×.

L.
5
54

body of fat tissue is situated in each side below the lateral parts of the pericardial septum. From there a flat layer of fat tissue extends, in each side, downwards laterally to the intestine and reaches, not far from the ventral side of the animal, two groups of longitudinal muscles. In the median line, between the muscle groups, bodies of fat tissue appear at rather regular intervals. Consequently the centroventral cavity is divided, in a rough and incomplete way, into two, a central circular one round the intestine and coeca and a flat one occupying the ventral space between the bases of the pleopods. These are the central and ventral abdominal lacunes. DELAGE (1881, pl. 5, fig. 5) pictured the latter space in cross section though he gave much too sharp limits to it. From the lateroventral margin of this space one narrow lacune extends into each pleopodal protopodite.

The lateral septa as well as the incomplete walls formed by the fat tissue already stop, in *Ligia,* a short distance after the insertion of the last pair of pleopods, before the anus. Thus the blood of the central and ventral lacunes gathers here in one cavity and is sucked into the pericard through the large proximal opening of the latter. DELAGE (1881, p. 87) expressed the opinion that no blood enters the pericard of the isopods except through the branchiopericardial lacunes and, to a very small degree, through the minute lacunes in the dorsal tissues at the sides of the pericard. This statement is directly contradicted by the conditions of *Ligia* and, as we shall see, of the remaining oniscoids as well.



Cephalic "depuratory" tissue. Cross sections.—Fig. 35. *Porcellio pictus*. Fix. Flemming's strong fluid. 160 ×.—Fig. 36. *Cylisticus convexus*. 320 ×.

Attention was already been drawn above (p. 23) to the presence in *Ligia* of a comparatively small cavity delimited by a real septum above and behind the

VOL. 35 1954

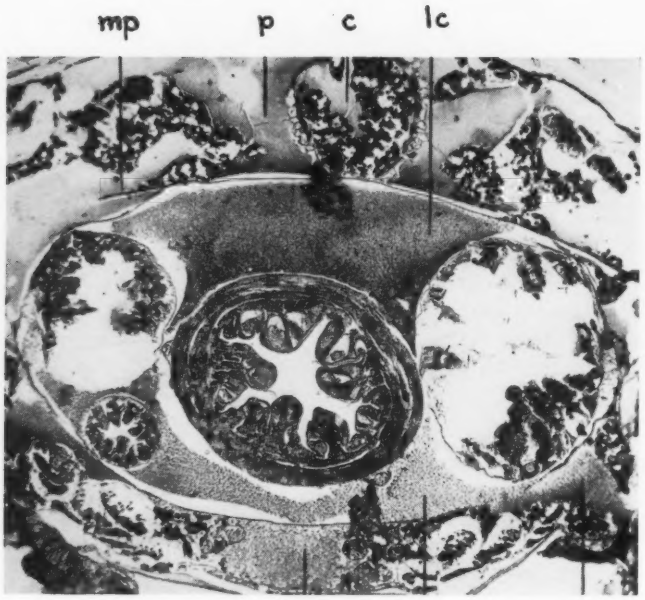
proximal part of the rectum, a cavity with no other outward communication than two branches of the abdominal arteries.

In the remaining oniscoids except *Haplophthalmus* the conditions in the present respect are identical and differ in the same characteristic way from those of *Ligia*.

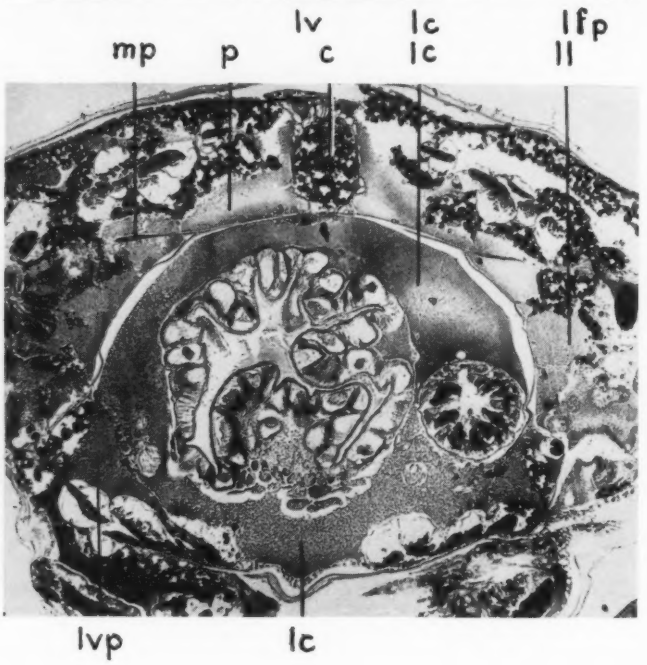
The centroventral abdominal cavity is divided according to approximately the same principles as in *Ligia*. However, the division is here almost complete, a horizontal, clearly defined septum extending below the intestine between the lateral septa from the anterior part of the 1st abdominal segment, where it is fixed by means of the lateral ends of its anterior margin, posteriad (fig. 38). Between the 4th and 5th pleopodal pairs the median part of its posterior margin is attached to the ventral body wall. From here the lacune dorsal to the septum, the central lacune, thus reaches the ventral body wall. From the ventral lacune blood is directly delivered to the four distal pairs of pleopods. The lateral parts of the ventral septum extend from the lower parts of the lateral septa obliquely inwards-downwards and are attached to the ventral body wall and continue in this way backwards to the bases of the 5th pleopods. Thus there are formed, from the proximal end of the large ventral lacune, two narrow lateral lacunes carrying the blood to the last pair of pleopods (fig. 39). (Cf. further fig. 20.)

The ventral septum is not quite complete. It is perforated by four pairs of ventrolateral openings situated exactly at those points where lacunes extend from the ventral lacune into the pleopods (fig. 38 to the right). We have consequently to assume that blood from the central lacune directly partakes in the supply of the pleopods.

The blood of the central lacune runs further backwards filling the proximal part of the body cavity surrounding the rectum and anus. Thus this posterior space does not represent, as in *Ligia*, a fusion of the central and ventral lacunes. No blood arrives here from the ventral lacune but that blood passes, in its entirety, the pleopods and then runs further directly to the pericard. The dorsal wall of the cavity, i.e. the posterolateral part of the pericardial septum, separates it from the cavities of the uropods but is evaginated into two "pseudoarteries" penetrating the uropods and their appendages as described on p. 25 (fig. 39). Through these "vessels" the blood of the central lacune is pressed into the uropods and then flows back in the anterior direction in lacunes represented by almost the whole of the remaining uropodal cavities. These lacunes are continued, within the abdomen, by two laterodorsal lacunes soon fusing and in this way give rise to the pericard. — LEREBOULLET (1852), above all BEPLER (1909, pp. 39 ff.), and VERHOEFF (1921) have demonstrated with a large degree of probability that the rectum has the function of an accessory respiratory organ, pumping water in and out by a special muscle system surrounding the intestine proximally to the sphincter delimiting the

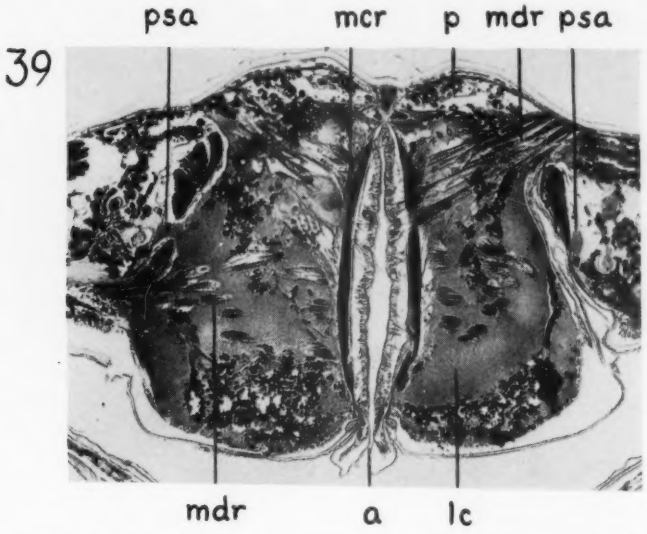


37



38

VOL.
35
1954

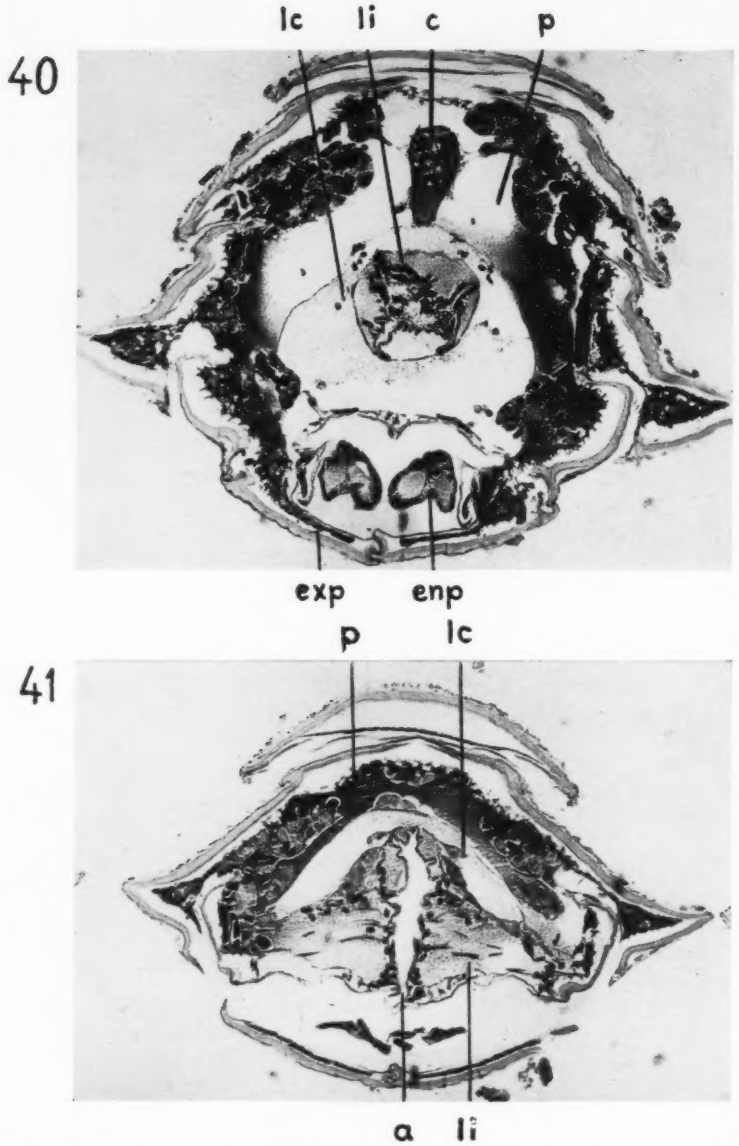


Porcellio pictus. Cross sections of abdomen. Fix. Flemming's strong fluid. Fig. 37. 3rd abdominal segment. Heart, pericard, central lacune with (to the right) connection with afferent pleopodal lacune, ventral lacune. 75 ×.—Fig. 38. 5th abdominal segment. Heart, pericard, central but no ventral lacune, lacunes to last pair of pleopods. 90 ×.—Fig. 39. Last abdominal segment. Dorsally proximal ends of pericard, round rectum-anus central lacune, in bases of uropods efferent uropodal lacunes. To the left departure of pseudoartery, to the right pseudoartery in uropod. 90 ×.

L.
5
54

rectum from the preceding part of the intestine (fig. 39). It should further be noted that the cuticle of the wide, protruding part of the body round the anus is extremely thin, as thin as in the respiratory surfaces of the pleopods. With regard to the lively blood circulation close below this cuticle it is thus probable that the blood is oxydized here too. The objections raised by REMY (1925, pp. 122, 130) against this proposition do not seem wholly convincing but make a certain caution necessary.

Haplophthalmus exhibits the same main features. However, there is one additional complication here. A septum is attached round the intestine in the vicinity of the sphincter before the rectum and then extends as a gradually widening tube round the latter, thus forming a lacune (the intestinal lacune) within the central lacune (fig. 40). At the anus the intestinal lacune reaches the ventral body wall to which the ventrodistal part of its septum is attached (fig. 41). Its dorsal wall approaches the proximal part of the pericardial septum and finally fuses with it. Thus the most proximal end of the body cavity is occupied by this intestinal lacune, into which blood enters from the central lacune through lateral openings in the anterior perpendicular part of its septum and from which the blood runs into the pericard in the same way as in the preceding species.—It is not altogether easy to discover the



Haplophthalmus danicus. Cross sections of abdomen. 135 ×. Fig. 40. 5th abdominal segment. Heart, pericard, central lacune, intestinal lacune. Connection between pleopodal exopodites.—Fig. 41. Last abdominal segment. Proximal ends of pericard and central lacune, intestinal lacune enclosing ventral body portion.

VOL.
35
1954

function of this lacune. Its main characteristic is that it forms a space closed at its anterior end but in open connection with the central lacune at its postero-ventral end. Considering the fact briefly referred to above that the rectum alternatingly dilates and constricts, thus pumping water to and fro possibly for the sake of respiration, we might guess that these movements make the volume of the lacune diminish and increase respectively, an activity resulting in a simultaneous pumping alternatingly to and fro of blood from the central lacune. This phenomenon would coincide with the probable function of the rectum as a respiratory organ.—Then there is the question of why this mechanism is absent in other oniscoids, where the rectum possibly has the same function. Perhaps we have to look for the explanation in the fact that *Haplophthalmus,* as is indicated by its anatomy, is to an unusual degree adapted to water respiration. REMY (1925, p. 118) and UNWIN (1932, p. 86) have stated that the ventrally (outwards) directed surface of the pleopodal exopodites has an extremely thin cuticle, their dorsal surface a very thick cuticle in all the oniscoids, this in contradiction to older, erroneous statements (STOLLER 1899, BEPLER 1909), according to which the reverse is said to be the case or the two cuticles are said to be alike. (Only in exopodites with tracheal organs is the ventral cuticle p a r t l y thicker, fig. 46.) They interpret this phenomenon, against the background of other anatomical as well as experimental facts, to mean that oxygen from the air enters here, and are no doubt right in their assumption. However, *Haplophthalmus* is an exception in this respect (figs. 40, 41). The ventral cuticle of the exopodites is thick, the dorsal one thin. Moreover, the margins of the exopodites of one and the same pair meet and are firmly attached to each other by means of protruding, curved lists fitting into excavations of a corresponding shape. In this way the exopodites form a coherent cover below an almost completely closed cavity, in which the endopodites protrude. The firm unity of this cover is demonstrated if a specimen is put into water. In all the oniscoids the pleopods begin to wave in these circumstances (VERHOEFF 1921, etc.). However, whereas they wave independently in the oniscoids in general, the cover formed by the exopodites moves to and fro as a single unit in *Haplophthalmus.* These facts indicate that *Haplophthalmus* does not breath ordinary air but that the fluid below the exopodites is the main or exclusive source of its oxygen supply and thus is of an even greater importance than in other oniscoids. This proposal coincides with the mode of living of the present type in wet earth. As the oxygen is mainly acquired from water by this animal, it follows that it has not the same possibility of acquiring a sufficient quantity of oxygen in a given space of time as the remaining oniscoids, which are provided with airbreathing organs as well, if the oxydation of the blood is not accelerated by a special mechanism.

It has been a matter of discussion as to whether only oxydized blood re-

enters the pericard in the isopods (cf. e.g. DELAGE 1881, p. 87, BRÜCKE 1923, p. 913, ZIMMER 1927, p. 724). According to the earlier opinion all the blood of the abdomen was thought to pass through the pleopods and the only openings into the pericard to be those of the lateral lacunes. Thus it was mostly thought that the pericard contained oxydized blood, a little mixed with venous blood from the abdominal pleurae. However, as we have seen here, the blood of the central lacune does not, largely, pass the pleopods but enters the pericard at its posterior end, in different ways in *Ligia* (where, moreover, some of the blood of the ventral lacune also arrives) and in the remaining oniscoids. The morphological facts thus indicate that the blood contained in the pericard is mixed to a considerable degree. As discussed above, it is possible that also the blood passing by the pleopods without entering them receives oxygen to some degree (in *Haplophthalmus* perhaps to a rather high degree) round the rectum and anus. However, it seems improbable that this oxydation could reach such proportions for the large quantities of blood in question to be characterized as arterial. The further loss of oxygen by this blood presumably taking place in the uropods of the species provided with "pseudoarteries" is certainly insignificant.

The fact has already been referred to above on different occasions that there is a considerable difference between *Ligia* and other oniscoids in the structure of the proximal parts of the central and ventral lacunes and pericard. The conditions of *Ligia* in this respect obviously offer a simple solution of the problem of the transfer of the blood from the central lacune into the pericard. The complicated conditions arising in the terrestrial forms are evidently connected with the disappearance of the abdominal arteries in them and the consequently necessary transfer of the blood via the pseudoarteries into the uropods for the supply of the latter.

VOL. 35 1954

The lacunar system of the body in the aquatic isopod groups exhibits, regarding the main courses, the same pattern as in the oniscoids. When making this statement we disregard such variations in details of minor importance as, for instance, when in *Asellus* there is only one, broad lateral lacune in each side of the abdomen (cf. above the conditions in *Haplophthalmus*), etc.

However, when we sum up the characteristics of this system in the different isopod types, we find general tendencies deviating in a significant way.

In the aquatic forms one can hardly speak of a real s y s t e m of lacunes, generally. Having left the arteries the blood arrives in a schizocoel consisting in interspaces between the organs and tissue bodies, exhibiting no adaptation in their position to the regulation of the blood currents. But few arrangements exist to direct the currents or separate special currents. Such arrangements when present — as is mainly the case in the abdomen to direct the flow via the respiratory pleopods to the pericard — are mostly simple and incomplete

or even fragmentary. Septa occur only in the limbs and in the area from the pleopods to the pericard.

Already in *Ligia* the picture is different. We have seen above that regular blood courses dominate there. However, in the entire head and thorax and part of the abdomen the lacunes are separated by organs and strips of fat tissue only, partitions, moreover, that are incomplete and can hardly be supposed to keep the respective currents fully apart. As in the aquatic forms septa appear in the pleopods—pericard area.—In *Haplophthalmus,* though closest to the amphibious forms, the lacunar system of the abdomen is highly but peculiarly developed, possibly in connection with a special mode of respiration.

In the really terrestrial oniscoids the picture has changed altogether. From the head to the abdomen the blood is carried in a fixed system of lacunes mainly delimited by septa. Blood currents of different origin and with different destinations are kept completely separate and in many places intricate arrangements appear securing a detailed regulation of the circulation. In addition to the account given above the conditions in the pleopods to be described in the next chapter can be referred to as a significant example.

Thus we find, in the isopods, a series of types with increasingly complete and differentiated lacunar systems represented by the aquatic forms, *Ligia* and possibly other amphibious forms, and the true terrestrial oniscoids. Aberrant parasitic forms are not taken into consideration.

5. CIRCULATORY SYSTEM OF PLEOPODS.

As is well known, the pleopods constitute the chief respiratory organs of the isopods.

Already DELAGE described the general course of the blood in them. One simple lacune enters the protopodite and then divides into two lacunes leading to the exo- and endopodites respectively (when these two parts are simultaneously present) (fig. 42). In the same way the blood is carried from the pleopod by two lacunes fusing into one in the protopodite. The course of the venous blood extends along the side of the limb turned to the median line of the animal, the arterial blood along its opposite, lateral side. This is a natural arrangement considering that the source of the venous blood occupies the ventromedian part of the abdomen whereas the lacunes removing the lateral blood occupy its lateral parts.

The details of the lacunar system of the pleopod endopodites, which appears to be uniform in the oniscoids, have been treated, above all, by LEREBOULLET (1852), BEPLER (1909), MÖDLINGER (1931), and UNWIN (1932), and there is nothing to add to their descriptions (cf. figs. 1, 26). The main characteristic is the presence of a horseshoe-shaped main lacune extending through the en-

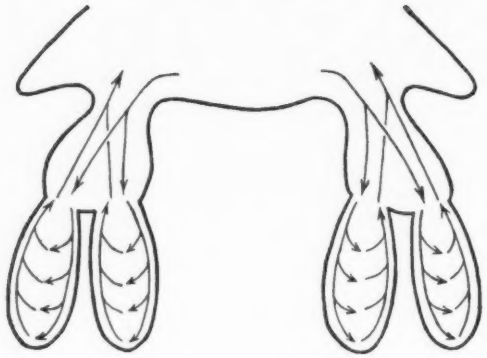


Fig. 42. Diagram of blood circulation in pleopods of one segment in isopod.

tire endopodite. The hypodermis is very thin ventrally to that lacune, whereas the flat lacunar system—only incompletely divided by "pillars"—occupying the rest of the endopodite is surrounded by an extremely high hypodermis.

As to the exopodite the original, simple conditions as described by DELAGE are met with in those exopodites of the oniscoids where no special complications of the structure have appeared. In most exopodites of this type the tissues are represented by the hypodermis enclosing a flat lumen and by pillar cells traversing the latter in the dorsoventral direction. However, in *Ligia* the exopodites are to a great extent occupied by fat tissue, which is penetrated by the tubular, richly branching lacunes as has been indicated by DELAGE (op. cit., pl. 5, fig. 5) and has been thoroughly described by UNWIN (op. cit., pp. 79 ff., pls. 16, 17) (cf. fig. 1). On one point I do not feel inclined to agree with UNWIN'S statements. He describes lacunes as running immediately below the ventral cuticle, thus without any hypodermis separating them from the latter (op. cit., pl. 17, figs. 68, 69). Corresponding pictures are quite common in my sections, but these lumina are without doubt artifacts formed by the separation of the hypodermis from the cuticle during the fixation. The fact that the pillar cells are still attached to that cuticle is not surprising as their fibres of attachment are continuous with the cuticle.

It is a well known fact that several genera (*Porcellio, Tracheoniscus, Cylisticus, Armadillidium, Cubaris,* etc.) of the oniscoids are provided with so-called tracheal organs in the two distal, or more, pairs of pleopodal exopodites. They are air-breathing organs (cf. VERHOEFF'S survey 1921) occupying a large part of the lateral wing of the exopodite, immediately below the attachment of the latter to the protopodite. In these exopodites the course of the blood has changed considerably (fig. 43). On the one hand the main features of the original type of circulation are still distinctly recognizable. The entering blood follows a large lacune extending along the anterior and median margins of the exo-

VOL. 35 1954

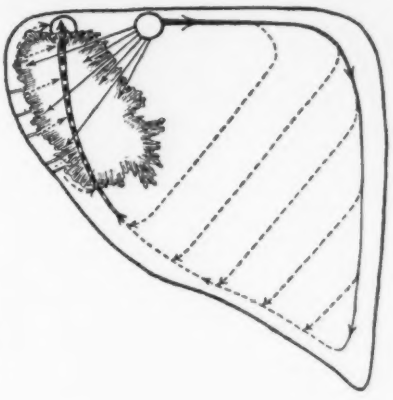


Fig. 43. *Tracheoniscus rathkei.* Ventral view of blood circulation in exopodite of 5th pleopodal pair. Tracheal organ with its—in this type—several microstomata indicated. Afferent currents continuous, efferent currents broken.

podit. It runs further in numerous small lacunes issuing from along that afferent lacune to the opposite side of the exopodite, where it gathers into a main efferent lacune at first following the posterior and lateral margin of the exopodite. Its last portion, however, runs at some distance from the margin and passes on the dorsal side of the tracheal organ, on the distal side of which it continues directly into the protopodite. On the other hand one wholly new feature has been added. From the entrance of the afferent lacune a strong and broad blood current runs directly in the posterior-lateral direction in a large number of small parallel lacunes towards the tracheal organ. It runs between the branches of the latter (figs. 46, 47), apparently wholly on its ventral side, turns round its lateral margin, moves back in the opposite direction on the dorsal side of the organ and finally fuses with the main current of the efferent lacune.

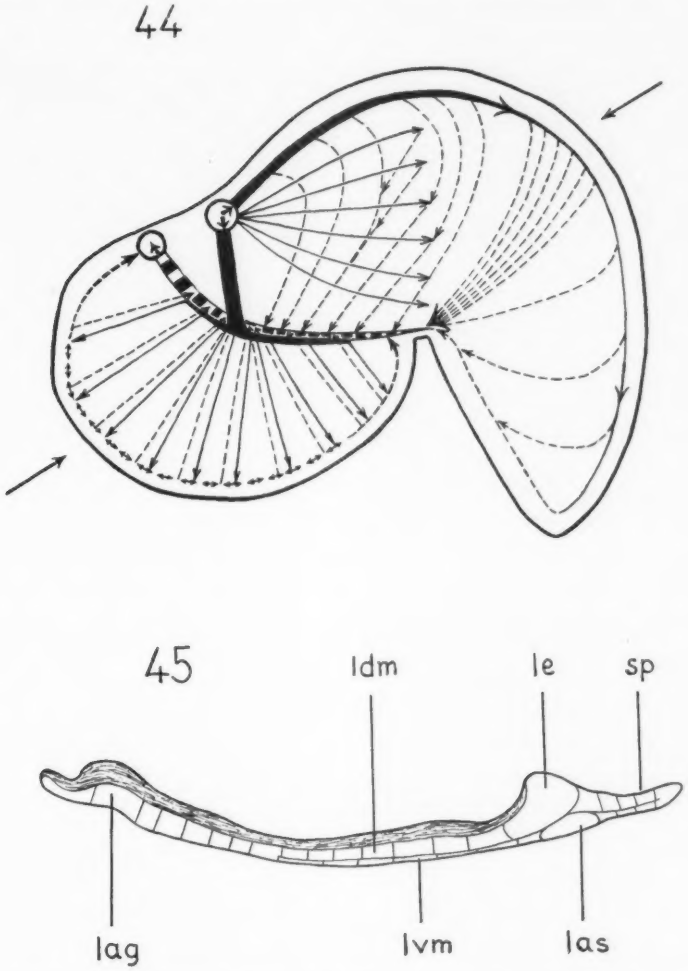
In *Oniscus* there are no tracheal organs. However, the lateral wing of each exopodite is of a special structure and constitutes the most active part of the respiratory organ. STOLLER (1899, p. 24 ff., pl. 2, figs. 11—14) has described the structure and circulation of the exopodite. His description, however, is incorrect in various respects. The lacunes of the pleopods of the oniscoids in general (except *Ligia,* cf. above) are delimited by rows of pillar cells effecting a general but not complete separation of them. STOLLER observed that there are, in *Oniscus,* horizontal membranes as well, situated about midway between the dorsal and ventral walls. He expressed, i.a., the opinion that in the lateral, so-called "special part" there are two membranes between which air would be contained, an opinion that has already been rejected by BEPLER (1909, p. 25), HEROLD (1913, p. 507), VERHOEFF (1921, p. 412), and UNWIN (1932, p. 50). STOLLER's picture of the blood circulation is very incomplete.

In fact there is one horizontal membrane in *Oniscus,* extending through a large part of the exopodite and thus dividing part of its cavity into a dorsal

and a ventral chamber.—From the mouth of the afferent lacune a strong current is seen to follow a large but gradually diminishing lacune extending along the median, curved margin of the exopodite (figs. 44, 45). The blood traverses in narrow lacunes the "general part" of the exopodite and arrives via a strong efferent lacune extending along the border between the "general part" and the "special part" back into the protopodite. This part of the circulatory system obviously corresponds to the usual, simple one.—It is further seen that blood departs from the mouth of the afferent lacune at a point closely proximal to the former current. This current is more feeble and follows a fan of small lacunes extending in the straight median direction in a course traversing almost at right angles the course of the small lacunes described above. Having reached approximately the median line of the "general part" the blood suddenly turns, runs into the former lacunar system and is carried to the efferent lacune. It is distinctly seen that the blood of the latter lacunar system runs ventrally to the former one. Sections show that the horizontal membrane has an extension in the "general part" exactly corresponding to the extension of the lacunar system in question. Thus its blood passes, in this area, in lacunes ventral to that membrane and runs, at the edge of the membrane, into the former lacunar system, which extends dorsally to the membrane further to the efferent lacune.—In the "special part" unusually dense rows of pillars extend, near each other, from the level of the efferent lacune almost to the margin of the part. A narrow space is left between their ends and the margin. A horizontal membrane is continuous throughout the whole area. A particularly strong blood current follows a wide lacune extending in the proximal direction, from the mouth of the afferent lacune down to a lacune extending parallelly to the efferent lacune on the ventral side of the latter. From this lacune the blood rushes through the system of lacunes ventral to the horizontal septum. Having reached their marginal ends it turns round the margin of the horizontal septum, rushes back in the lacunes dorsal to the latter and arrives through them in the efferent lacune. However, the further movement of the blood that has arrived in the margin of the "special part" is a little more complicated, in fact. The blood cells contained in it are often seen to be carried a little sideways along the marginal lacune before they enter a returning lacune. This phenomenon becomes increasingly common towards the anterior and posterior ends of the "special part" and in the extreme parts of the marginal lacune constant, rather strong blood currents appear directed respectively to the inner end of the efferent lacune and to its departing end.

Thus there is, in exopodites with tracheal organs as well as in those of *Oniscus,* a double blood circulation. To the original lacunar system has been added an independent system supplying the "special parts" of the exopodites. It is most elaborate and perfect in *Oniscus,* where with certainty no blood of the "general part" enters the "special part" or the reverse; the only lacune

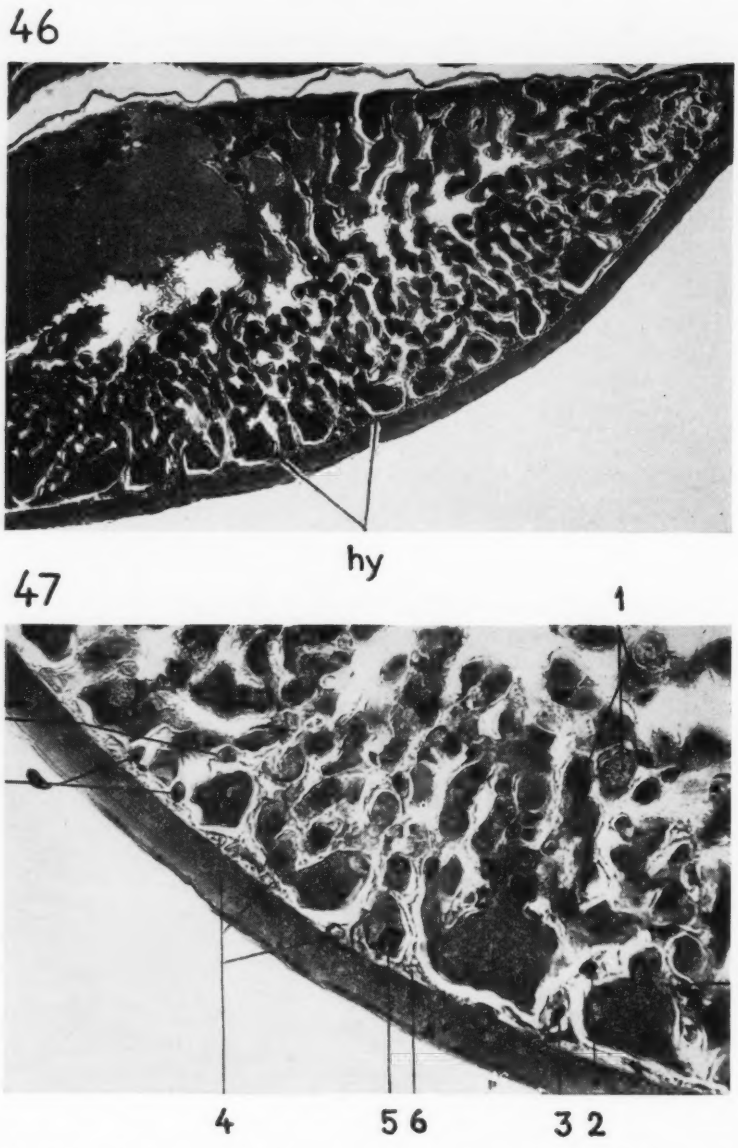
VOL. 35 1954



Oniscus asellus. Fig. 44. Ventral view of blood circulation in exopodite of 1st pleopodal pair (in female). Afferent currents continuous, efferent currents broken. Pointers indicate approximate direction of cross section pictured in fig. 45.—Fig. 45. Section of exopodite of 3rd pleopodal pair. 85 ×.

common to the two systems (within the exopodite) is the distal part of the efferent lacune. In *Oniscus* a further complication has appeared, the ventral lacunar system in the lateral area of the "general part".

This seems the place to make some remarks concerning the air-breathing organs themselves in the oniscoids. They have been studied by a great many authors, including STOLLER (1899), BEPLER (1909), BERNECKER (1909),



Porcellio scaber. Tracheal organs. Longitudinal sections of 2nd pleopodal pair in adult. Ventral side down. Fix. Flemming's strong fluid. Blood dark.—Fig. 46. General survey of main canal (to the left) and branches of tracheal organ. 160 ×.—Fig. 47. The same, ventral portion. 1: blood cell. 2: large dark nucleus at interior portion of branch. 3: large dark nucleus beside end of branch. 4: light nucleus of hypodermis of ventral wall. 5: anastomosis of branches. 6: end of branch in hypodermis. 320 ×.

VOL. 35 1954

HEROLD (1913, 1925), VERHOEFF (1921), REMY (1925), MÖDLINGER (1931), and UNWIN (1932).

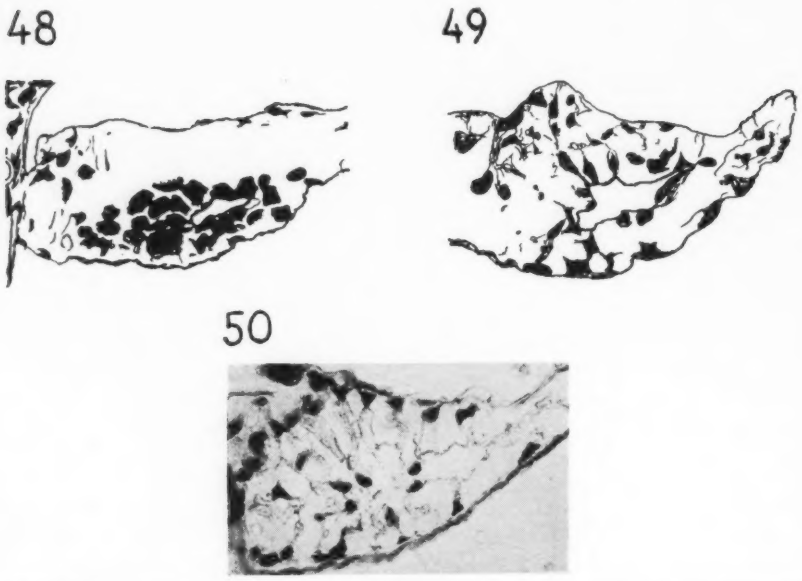
The usual type of air-breathing organs are the tracheal organs ("white bodies" or "air trees"), richly branched invaginations into the exopodites of some or all pleopods (figs. 46, 47). In most forms this type is represented by one canal branching at its inner end. More rarely (*Tracheoniscus*) several smaller canals enter the exopodite and then fuse into one main canal (fig. 43). The "special parts" of the exopodites in *Oniscus* are of a different type as an interior canal system for the air is lacking.

VERHOEFF tried to arrange those types into a developmental series. The basis for the attempt is their unvarying situation in the lateral parts of the exopodites. He considered the, in fact extremely shallow, furrows present on the surface of the "special part" in *Oniscus* to have closed into the several canals in *Tracheoniscus,* which would then have fused into the single canal in other forms, to put it diagrammatically.

However, the above description of the internal structure of the exopodites in question in *Oniscus* on the one hand and in forms with tracheal organs on the other, has revealed differences so considerable that the possibilities of finding a comprehensive formula for the two types seem small. The structure of the exopodites in question of *Oniscus* is, in fact, much more complicated than in the latter ones, *Oniscus* appearing as a type that is highly specialized though along a different line than the latter.

As nothing was known concerning the early development of the tracheal organs—except for a few cursory observations made by BEPLER on unsectioned material—the present author undertook an investigation in this respect of *Porcellio scaber,* a form provided with the usual type of tracheal organ with one entrance canal. It can be stated that no features at all were found that could be interpreted in any way in favour of VERHOEFF's hypothesis. On the contrary, the development from the very first follows a course directly leading to the conditions found in the adult. The tracheal organ first appears in specimens belonging to the 1st larval stage but still in the marsupium (figs. 48, 49). One simple invagination is formed, the inner end of which gives rise to a few shallow invaginations of the second degree. At the inner ends of the latter single cells characterized by their oblong shape are situated. These invaginations grow further (fig. 50) and give rise to the air capillaries of the adult organ. The cells at their ends grow likewise, become cone-shaped and soon become attached with their inward—turned ends to the exterior cuticle of the exopodite. These previously overlooked cells anchor the ends of the air capillaries to the wall of the exopodite in the adult (figs. 46, 47).

The corresponding situation of the air-breathing organs of *Oniscus* and the tracheal organs does not necessitate any ideas of homology but can be simply explained according to other principles. It is only natural that air-brea-



Porcellio scaber. Developmental stages of tracheal organ. 320 ×. Fig. 48. 1st larval stage from marsupium. Rudiment of tracheal organ near its mouth.—Fig. 49. The same. Single small evaginations with prolonged hypodermal cells.—Fig. 50. 2nd larval stage (escaped from marsupium). Branches of tracheal organ connected with outer wall.

VOL. 35 1954

thing organs of any considerable effect develop in connection with the respiratory organs already existing considering the adaptation of the circulatory system to this position of the respiratory organs; the pre-requisite condition for the realization of other possibilities would have had to be a total transformation of the circulatory system. The endopodites of the pleopods are immersed in water (now disregarding the secondarily arisen conditions in special forms such as *Cubaris*), the dorsal surfaces of the exopodites are likewise covered with water. Against the background thus sketched, it is precisely the lateral margins of the exopodites that stand out as possessing the qualifications for the origin of air-breathing organs there. The lateral expansion of these parts in the oniscoids may then be a condition for or a function of the appearance of the organs, or be partly due to both.

All in all, the available facts make the present author inclined to look upon the air-breathing organs of *Oniscus* and the tracheal organs of other terrestrial oniscoids as analogous but not homologous structures.

6. DISCUSSION.

We have seen above that the dominating characteristic of the system of true vessels of the oniscoids, in comparison with the conditions in other isopods,

is the distinct reduction of its extension, a reduction gradually increasing parallelly with an increasingly terrestrial mode of life.

This feature might be claimed to fit in well with the rule discerned by VANDEL (1943) that the oniscoids differ from the aquatic forms, largely, in a regression and simplification of structure. His arguments were provided by numerous external characters but by certain internal ones as well, viz. the coeca, the brain, the abdominal part of the neural cord, and the eyes. This tendency was traced also in the oniscoids, from amphibious to really terrestrial forms, to express it summarily.

Even if this is true we must, however, take into consideration the remaining portions of the circulatory system, the lacunes, also when trying to estimate the degree of perfection of that system from a functional point of view. When thus the entire circulatory systems in aquatic isopods and in terrestrial oniscoids are compared we come to a quite different result. The strictly defined, often vessel-like lacunes of the latter join the true vessels to form a, practically speaking, almost complete system, securing a regulated and swift transport of the blood throughout the body. This is a picture contrasting with the conditions met with in the aquatic forms, where the blood is carried comparatively far by the vessels but then is left to find its own way along only generally defined courses until it reaches the pericard again.

Ligia represents an interesting intermediate stage.

We thus get a type series diagrammatically characterized as follows:
aquatic isopods: vessel system well developed,
lacunar system indistinctly differentiated;
amphibious isopods (*Ligia*): vessel system somewhat reduced,
lacunar system more differentiated;
terrestrial isopods: vessel system considerably reduced,
lacunar system well differentiated.

This tendency even goes so far that in the terrestrial forms lacunes partly replace vessels present in the aquatic ones, functionally as well as to some degree in position. Some examples of this have been related above in different connections. Thus the afferent pleural, subneural, and abdominal vessels in the aquatic forms are replaced by the afferent pleural and subneural lacunes and pseudoarteries in the terrestrial ones.

It seems justified to conclude that these conditions are connected with the mode of life. That changes of this type occur is, moreover, only to be expected on theoretical grounds. On the one hand the forms with terrestrial habits are burdened with the necessity of carrying their bodies without any considerable aid from the surrounding medium, on the other a terrestrial life renders a more energetic behaviour possible, to mention only two examples of the numerous consequences inherent in the change from aquatic to terrestrial life, all of which

combine to increase the stress placed on the organ systems concerned with the metabolism.

The connection between the reduction of the vessel system and the differentiation of the lacunar system, is likewise obvious. It appears sensible to assume that one of the two phenomena is primary to the other. If so, which is the primary one? It stands to reason that the increased demands on the circulatory system caused by the terrestrial life can be expected to effect, above all, the undifferentiated parts of the system, which would mean in the present case that it brings about a perfection of the lacunar system. In this way the effect of the entire system can be easily and considerably increased whereas the same effect can hardly be imagined to be attained by a reduction of the already strictly regulated vessel system. Thus the differentiation of the lacunar system represents, in all probability, the primary modification, in relation to which the reduction of the vessel system is a secondary effect.

There are special features as well that can be fitted into the picture thus sketched of an increased activity of the circulatory system in the terrestrial forms. Such are the unusually great volume of the heart in relation to body size and the increase in strength of the alary muscles. Further, the following condition is worth considering, viz. that the blood courses leading caudad from the head (beside the aorta and its continuation) are arranged so that at least the greater part of the blood, possibly all of it, has to pass close by the maxillary glands, where a veritable capillary net of lacunes is formed. The appearance of intricate lacune systems round the air-breathing organs represents a more special case, the direct dependence of which on the terrestrial life is self-evident.

VOL.
35
1954

To deduce the circulatory system of the oniscoids from a general aquatic isopod type is an easy task. The lacunar system is only comparable in a very general way as the detailed differentiation of it has arisen within the oniscoids. However, the premises for the latter are distinctly recognized in the conditions in the aquatic type. Almost every detail of the vessel system appearing in the oniscoids is met with in the aquatic isopods as well (we will return to the exceptions). This sentence, however, cannot be reversed. Largely, the former has developed from that of the latter by simple loss.

When estimating the connections between the oniscoids and any specified recent aquatic isopod group, however, the circulatory system is of but little value.

The general conformity of the vessel system in the latter is an obstacle to such an attempt. Only the Asellota are directly excluded in view of the absence in them of the 1st pair of lateral arteries still present in the oniscoids.

Two positive features possibly of importance are seen in the vessel system of the oniscoids.

One is represented by the abdominal branches of the 5th (last) lateral arteries in *Ligia* (branches that are absent, possibly by reduction, in the terrestrial oniscoids). Their extension is considerably reminiscent of the branches of the 6th lateral arteries present in the aquatic isopods but absent in the oniscoids. These conditions are not easily interpreted. To imagine some sort of transfer of the branches from the 6th to the 5th arteries in connection with the reduction of the former, seems far-fetched, inasmuch as there is no real identity of pattern. Further, the assumption does not appear convincing that such branches might exist simultaneously in the 5th as well as the 6th arteries in some hypothetical ancestral form. There remain two possibilities for serious consideration, viz. that the branches in *Ligia* have developed as new formations in connection with a reduction of the 6th arteries, or that the 6th arteries have never existed in the phylogenetic line leading to the oniscoids. The available facts do not suffice to enable a choice to be made between these possibilities now.

The second positive feature is represented by the considerable length of the heart in all oniscoids. Considering the origin of the heart as a differentiation of the dorsal vessel, this heart might be said to be more primitive than the shorter types characteristic of the aquatic forms. The conclusion would then be that the oniscoid heart cannot be derived from a state found, as far as known, in any recent aquatic form but that it represents an ancient type placing the oniscoids at the side of the aquatic isopod groups without direct connections with any of them. However, on the other hand the arrangement of the lateral arteries on the heart can be claimed to indicate that the short heart type has arisen, simply, by a shortening of the long heart type and that the two types are thus fully homologous. This is evidently unstable ground and a great deal of caution is certainly recommendable inasmuch as our detailed knowledge of the ontogeny of the heart in the isopods is as yet fragmentary.

The meagre result implies that both of the characters discussed are too ambiguous to allow of any conclusions in the present respect.

When considering an animal group, part of which lives in the sea (or anyhow in water) but another part on land one might expect profound differences in structure.

In this wider aspect the anatomical differences in the circulatory system as between oniscoids and aquatic isopods appear astonishingly small. There exist significant differences as demonstrated above. However, these consist in comparatively superficial modifications, in the oniscoids, of structures already existing in the aquatic forms, modifications to a considerable degree consisting in loss. The fundamentals of the system are not touched.

The air-breathing organs of the terrestrial species are typical new formations, without counterparts in the aquatic forms as well as in other animal

groups as they are. Nevertheless, they are formed in direct connection with the aquatic respiratory organs and a fundamental change of the circulatory system is not required. Further, it was argued above that we are dealing with two types of air-breathing organs here, the Oniscus type having developed independently of the tracheal organs of other terrestrial forms.

Similar tendencies can be discerned also in other structures not dealt with in the above investigation.

Already the aquatic isopods, though able to swim, are preferably walking animals, in which the body is thus raised over the substratum by limbs resting on the latter. This is, of course, expressed in the structure and arrangement of the thoracopods. The dorsoventrally depressed, uncurved body and the predominance in length of the body portion directly supported by the walking legs, i.e. the thorax, are well suited for this mode of progress. This is a combination of features indispensable for wingless arthropods living in a medium giving them no support, i.e. in air.

The mode of feeding, the mouth parts, and the alimentary canal of the non-parasitic aquatic forms are of a type equally suited for terrestrial life and for aquatic life, fundamentally. Approximately the same can be said about the organs of reception. A curious amendment is represented by the sensory hairs situated on the eyes of amphibious and, above all, terrestrial isopods in a way similar to that occurring in insects as reported by DAHL (1951). That fertilization is secured by copulation, a method indispensable in terrestrial conditions, is only in accordance with what is the rule in the crustaceans.

A final, very important premise for terrestrial life lies in the isopods being peracarids: they possess a marsupium and the brood can be reared almost or wholly independently of the environment. This means a possibly decisive difference in respect of the only other crustacean group that, among the types which have "tried" to invade land, has met with a certain success, i.e. the gecarcinids. Though the latter have in other respects considerable structural qualifications to enable them to perform this transition, they have not attained the full adoption of terrestrial life exhibited by most oniscoids. Such a fact that they depend on moist air to prevent the desiccation of their still aquatic type of respiratory organs, might be looked upon as a less important imperfectness. But that they are compelled to return to water for their propagation, is a fact which demonstrates in an instructive way that they are, fundamentally, still aquatic animals only paying visits, though regular ones of very long duration, to terra firma.

Against the background of the examples thus sketched, it is no wonder that precisely the isopod group among the fundamentally aquatic phylum of the crustaceans has given rise to true terrestrial forms. One gets a strong impression of the high degree in which it must have been preadapted in its main structure to terrestrial life. Post-adaptation has only consisted in a touch here,

VOL. 35 1954

a touch there perfecting the interaction between the animal and its new environment.

Of course, numerous physiological considerations are involved in this problem. Unfortunately, however, the facts available are so fragmentary that nothing can be said about this matter at present besides the quite general reflections indicated above.

It has been postulated throughout the present paper that the terrestrial isopods have originated from aquatic isopods, as has been universally done. When considering the fundamental agreement in structure just demonstrated an assumption to the contrary might possibly not seem so wholly absurd as at first. For instance, one might guess that precisely the isopod character—as opposed to that of other members of the Peracarida—might have arisen in connection with a terrestrial (or perhaps even better from a theoretical point of view, amphibious) life on the part of the common ancestors of the recent groups. However, a glance at the circulatory system is enough to kill such an idea. To deduce the vessel system of the terrestrial isopods from that of the aquatic isopods is easy, to do the reverse is impossible. Numerous corresponding examples are provided by other structures.

L.
5
54

7. SUMMARY.

Only some few major points are briefly reviewed.

1. The circulatory system was examined in the oniscoid genera *Ligia* and *Haplophthalmus* (amphibious forms) as well as *Oniscus, Porcellio, Tracheoniscus, Cylisticus, Armadillidium,* and *Cubaris* (terrestrial forms) and further, for comparison, in members of the aquatic isopod groups Gnathoidea, Anthuridea, Asellota, Valvifera, and Flabellifera.

2. The heart is described. In relation to body size, it is 25—100 % longer and has a considerably greater volume in the oniscoids than in the aquatic forms. Seasonally, fat tissue occupies a great part of it in the former whereas it is continually sparse or absent in the latter.

3. The vessel system is described. The aorta and the 1st lateral arteries intimately connected with it run straight to the head, where their further, intricate extension is described. In *Ligia* the 2nd—5th lateral arteries extend to the thoracopods and, further, give off branches i.a. forming an incomplete subneural artery; from the 5th pair branches extend to the abdomen. In the terrestrial forms the arteries are generally shorter; the subneural and abdominal arteries are lacking. In the aquatic isopods the vessels have a wider extension; a usually complete subneural artery is present as well as a 6th pair

of lateral arteries with branches to the intestine and abdomen. In *Asellus* the 1st lateral arteries are absent.

4. The lacunar system is described. All isopods possess a pericard fully delimited by a horizontal septum provided with segmentally arranged, striated alary muscles. A considerable part of the blood moving through the abdomen does not pass the pleopods and the blood contained in the pericard is not wholly arterial. Outside the pericard and vessel system the blood moves, largely, along very generally defined courses in the aquatic isopods. In *Ligia* the courses are better delimited into more or less separate lacunes, in the terrestrial oniscoids they are mostly completely separated by clear septa and form an exactly regulated, partly intricate and vessel-like system.

The maxillary glands are situated in the blood currents leading from the head backwards; in the oniscoids most or all blood is made to pass intricate systems of lacunar capillaries in these organs. In the place of the missing subneural artery the terrestrial forms possess a subneural lacune. Vessel-like lacunes, "pseudoarteries", supply the hindermost part of the abdomen in the terrestrial species, where no abdominal arteries exist.

The complicated lacunar systems of the air-breathing organs in terrestrial forms are described. They are of two types, the "Oniscus type" and the "Porcellio type", and it is argued that they are not homologous, a proposition that is further supported by ontogenetical observations on the air-breathing organs themselves.

The lacunes fuse into larger and fewer lacunes in the posterior direction. Exceptions to the rule are the lacunar nets of the maxillary glands and respiratory organs. They represent portal systems.

5. It is concluded—as elucidated by a comparison between aquatic, amphibious, and terrestrial forms—that the lacunar system becomes more complete in connection with the transition to terrestrial life. The vessel system is simultaneously reduced, a phenomenon probably secondary to the former.

The final result is a perfection of the circulatory system as a whole. This is connected with the higher demands made by terrestrial life on organs concerned with the metabolism as is further illustrated by the great heart volume, strong alary muscles, etc., in terrestrial forms.

6. The vessel system of the oniscoids can be deduced chiefly by loss from the rather uniform conditions in aquatic isopods. The possibilities of deducing it from the conditions of a specified aquatic group, are small. Positive features in the oniscoids, such as the great length of the heart as well as the presence in *Ligia* of certain branches of the 5th lateral arteries, are possibly to be interpreted so as to eliminate the direct deduction of the group from aquatic types still represented but indicate its great age.

7. The aquatic isopod type is primary to the terrestrial type. The differences in structure between them never affect the fundamentals but consist, in the

VOL.
35
1954

latter, in modifications of and small amendments to the premises given. This illustrates the high degree in which precisely the isopods among the fundamentally aquatic crustaceans have been preadapted for terrestrial life. Examples are provided by the mode of progress, body shape, legs, feeding, respiratory organs, circulatory system, propagation, etc.

LITERATURE.

AUDOUIN, V. & MILNE EDWARDS, H. 1827. Recherches anatomique et physiologiques sur la circulation dans les Crustacés. Ann. Sci. Nat., Sér. 1, 11.

BEPLER, H. 1909. Über die Atmung der Oniscoideen. Diss. Minden i. Westf.

BERNECKER, A. 1909. Zur Histologie der Respirationsorgane bei Crustaceen. Zool. Jahrb., Abt. Anat., etc., 27.

BETHE, A. 1926. Vergleichende Physiologie der Blutbewegung. Handb. d. normal. u. pathol. Physiologie, 7, 1. Berlin.

BROCCHI, — 1875. Recherches sur les organes génitaux mâles des Crustacés décapodes. Ann. Sci. Nat., Sér. 6, 6.

BRUNTZ, L. 1903. Contribution à l'étude de l'excretion chez les Arthropodes. Arch. Biol., 20.

— 1907. Sur l'existence d'organes globuligènes chez les Isopodes. C. R. Soc. Biol., 62.

BRÜCKE, E. T. VON. 1923. Die Bewegung der Körpersäfte. Handbuch d. vergl. Physiologie, 1, 1.

BURIAN, R. & MUTH, A. 1924. Die Exkretion (Crustaceen). Ibid., 2, 2.

DAHL, E. 1951. On lenses and sensory hairs in the cornea of some Crustacean orders. Ark. Zool., S. 2, 2.

DELAGE, Y. 1881. Contribution à l'étude de l'appareil circulatoire des Crustacés Édriophthalmes marins. Arch. Zool. Exp. et Gén., 9.

DELLA VALLE, A. 1889. Intorno acli organi di escrezione di alcuni Gammarini. Boll. Soc. Nat. Napoli, S. 1, 3.

— 1893. Gammarini del Golfo di Napoli. Fauna u. Flora d. Golfes v. Neapel, 20.

DOGIEL, J. 1877. De la structure et des fonctions du coeur des Crustacés. Arch. Phys. Norm. et Path., 4.

DOHRN, A. 1870 a. Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Arthropoden, 4. Entwicklung und Organisation von Praniza (Anceus) maxillaris. Zeitschr. Wiss. Zool., 20.

— 1870 b. The same, 5. Zur Kenntniss des Baues von Paranthura Costana. Ibid.

GADZIKIEVICZ, W., 1905. Ueber den feineren Bau des Herzens bei Malakostraken. Jenaische Zeitschr. Naturwiss., 39.

GAERSTECKER, A. & ORTMANN, A. E., 1901. Malacostraca. In: BRONN's Klass. u. Ordn. d. Thier-Reichs, 5.

HAFFNER, K. VON. 1933. Die Mechanik der Blutbewegung bei Phronima sedentaria. Verh. Deutsch. Zool. Ges., 35.

— 1934. Der Blutkreislauf von Phronima sedentaria, mit besonderer Berücksichtigung des lacunären Systems. Zeitschr. Wiss. Zool., 146.

HEROLD, W. 1913. Beiträge zur Anatomie und Physiologie einiger Landisopoden. Häutung —Secretion—Atmung. Zool. Jahrb., Abt. f. Anat. etc., 35.

— 1925. Untersuchungen zur Ökologie und Morphologie einiger Landasseln. Zeitschr. Morphol. u. Ökol. d. Tiere, 4.

HOLMGREN, N. 1916. Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns von Polychaeten, Ony-

chophoren, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden und Insekten. K. Svenska Vet. Akad. Handl., 56, 1.

KLÖVEKORN, J. 1934. Das Organsystem der Blutbewegung bei Gammarus pulex L. Zeitschr. Wiss. Zool., 146.

KOLLMAN, M. 1908. Recherches sur les leucocytes et le tissue lymphoide des invertébrés. Thése. Paris.

KOULWIETZ, A. 1899. La constitution et les fonctions du système sécréteur et lymphatique chez les Crustacés. Arb. Labor. Zool. Kabinett Univ. Warschau, 2.

KOWALEVSKY, A. 1864. Anatomie du Cancrelat des mers (Idothea entomon) et énumération des Crustacés qui se trouvent dans les eaux du gouvernement de Saint-Pétersbourg. Invest. Hist. Nat. Gouv. Saint-Pétersbourg, 1.

— 1894. Étude expérimentale sur les glands lymphatiques des Invertébrés. Bull. Acad. Imp. Sci. St. Pétersbourg, Sér. 2, 4.

LAZARENKO, T. 1925. Beiträge zur vergleichenden Histologie des Blutes und des Bindegewebes. II. Die morphologische Bedeutung der Blut- und Bindegewebeelemente der Insekten. Zeitschr. Mikr.-Anat. Forsch., 3.

LEREBOULLET, —. 1852. Mémoire sur les Crustacés de la famille des Cloportides qui habitent dans les environs de Strasbourg. Mém. Soc. Hist. Nat. Strasbourg, 4.

MANGOLD, E. 1924. Studien zur Physiologie des Krebsherzens, besonders über eine aktive Funktion des "Pericard" bei Cancer pagurus. Zeitschr. Vergl. Physiol., 2.

MARCHAL, P. 1891. Sur l'appareil excréteur des Caridides et sur la sécrétion rénale des Crustacés. C. R. Acad. Sci., 113.

MARTYNOW, N. 1896. Étude biologique sur le Cloporte. Mém. Acad. Imp. Sci. St. Pétersbourg, Sér. 8, 3.

MC MURRICH, J. P. 1895. Embryology of the Isopod Crustacea. J. Morph., 11.

MÖDLINGER, G. 1931. Beiträge zur Morphologie der Respirationsorgane der Landisopoden. Studia Zool. Univ. Budapest, 2, 1.

NEMEC, B. 1896. Studien über Isopoden. II. Sitz.-Ber. X. Böhm. Ges. Wiss., Math.-Naturwiss. Klasse, 38: 1.

NUSBAUM, J. 1886. L'embryologie d'Oniscus murarius. Zool. Anz., 9.

— 1899. Beiträge zur Kenntnis der Innervation des Gefässsystems nebst einigen Bemerkungen über das subepidermale Nervenzellengeflecht bei den Crustaceen. Biol. Zentralbl., 19.

PLATEAU, F. 1880. Recherches physiologiques sur le coeur des Crustacés décapodes. Arch. Biol., 1.

RATHKE, H., 1843. Beiträge zur Fauna Norwegens. Nov. Act. Acad. Leopold.-Carol. Nat. Curios., 20, 1.

REMY, P. 1925. Contribution à l'étude de l'appareil respiratoire et de la respiration chez quelques Invertébrés. Thèse. Nancy.

SAALFELD, E. VON. 1937. Untersuchungen über den Blutkreislauf bei Leptodora hyalina. Zeitschr. Vergl. Physiol., 24.

SARS, G. O. 1861. Histoire naturelle des Crustacés d'eau douce de Norvège. I. Les Malacostracés. Christiania.

STOLLER, J. H. 1899. On the organs of respiration of the Oniscidae. Zoologica, Stuttgart, 25.

TER-POGHOSSIAN, A. 1909. Beiträge zur Kenntnis der Exkretionsorgane der Isopoden. Zeitschr. Naturwiss. Halle, 81.

UNWIN, E. E. 1932. On the structure of the respiratory organs of the terrestrial Isopoda. Pap. & Proc. Roy. Soc. Tasmania.

VOL. 35 1954

VANDEL, A. 1943. Essai sur l'origine, l'evolution et la classification des Oniscoidea (Isopodes terrestres). Bull. Biol. France et Belg., Suppl. 30.

VEHSTEDT, R. 1941. Über Bau, Tätigkeit und Entwicklung des Rückengefässes und des lacunären Systems von Artemia salina, var. arieta. Zeitschr. Wiss. Zool., 154.

VERHOEFF, K. 1920. Zur Kenntnis der Larven, des Brutsackes und der Bruten der Oniscoidea. Zool. Anz., 51.

— 1921. Über die Atmung der Landasseln, zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Entstehung der Landtiere. Zeitschr. Wiss. Zool., 118.

WAGNER, N. 1865. Recherches sur le système circulatoire et les organes de la respiration chez le Porcellion élargi (Porcellio dilatatus). Ann. Sci. Nat., Sér. 5, 4.

WALKER, B. 1935. The central nervous system of Oniscus (Isopoda). J. Comp. Neurol., 62.

WEBER, H. 1949. Grundriss der Insektenkunde. Ed. 2. Jena.

WETTSTEIN, O. VON. 1915. Über den Pericardialsinus einiger Decapoden. Arb. Zool. Inst. Univ. Wien, 20.

WINTERSTEIN, H. 1921. Die physikalisch-chemischen Erscheinungen der Atmung. Handb. d. vergl. Physiologie, 1, 2.

ZIMMER, C. 1927. Isopoda, Asseln. KÜKENTHAL—KRUMBACH, Handb. d. Zoologie, 3: 1.

ABBREVIATIONS.

a anus
aa a. abdominalis
aan a. antennalis
ac arcus cephalicus aortae
ad abdominal "depuratory" tissue
ado 1 a. dorsalis posterior
ado 2 a. dorsalis anterior
af a. facialis
agl antennal gland
ai a. intestinalis
al 1—al 6 a. lateralis 1—6
an 2 antenna
ao aorta
aop a. optica
ap 1 a. perpendicularis posterior
ap 2 a. perpendicularis anterior
apl a. pleuralis
apo apodem
apr a. proximalis
asn a. subneuralis
at a. thoracopodalis
av a. ventralis
bad branches of abdominal "depuratory" tissue
bc blood cells
c heart
cc closing cells of end sac mouth of maxillary gland
cd cephalic "depuratory" tissue
co circulus oesophagi
cs coelomic sac of maxillary gland
dc deuterocerebrum
dpl departure of blood in lacunar system of maxillary gland
du duct of maxillary gland
ead epithelium-like layer of abdominal "depuratory" tissue
ebl entrance of blood in lacunar system of maxillary gland
ed exit-duct of maxillary gland
ehy elongated hypodermal cells
enp endopodite of pleopod
exp exopodite of pleopod
ft fat tissue
ftc fat tissue of heart
hp "hepatopancreas"
hy hypodermis
i intestine
ic invagination of cuticle at cephalic "depurator"
lag lacuna afferens of general part of pleopodal exopodit
las lacuna afferens of special part of pleopodal exopodit
lc lacuna centralis
lcf foramen of lacuna centralis through which blood runs to pleopod

ldm dorsal small lacune of pleopodal exopodit
le lacuna efferens of pleopodal exopodit
li lacuna intestinalis
ll lacuna lateralis
lm lacunar system of maxillary gland
lp lacuna proximalis
ls lateral septum
lsn lacuna subneuralis
lt lacuna thoracopodalis
lu lacuna uropodalis
lv lacuna ventralis
lvm ventral small lacune of pleopodal exopodit
lvp process of lacuna ventralis reaching 5th pleopod
m mouth
mcr m. constrictor recti
mdr m. dilatator recti
mp m. alaris
na nn. abdominales
nan n. antennalis
nc nerve cord
oec oesophageal connective
p pericard
pc protocerebrum
pp protopodite of pleopod
ps pericardial septum
psa pseudoartery of uropod
psd dorsal "pericardial septum"
r rectum
rgl rosette gland
so sinus oesophagi
sp special part of pleopodal exopodit
tc tritocerebrum
thd thoracic "depuratory" tissue
val 1 valves of a. lateralis 1
vao valves of aorta

VOL.
35
1954

UNTERSUCHUNGEN ÜBER BAU, ENTWICKLUNG UND PHYSIOLOGIE DER MILBE HISTIOSTOMA LABORATORIUM HUGHES

VON

ROLF PERRON

(Aus dem zoologisch-vergleichend anatomischen Institut der Universität Zürich)[1]

Herausgegeben mit Unterstützung der Karl Hescheler-Stiftung.

L.
5
54

INHALTSÜBERSICHT

I. Einleitung und Problemstellung 73
II. Systematische Stellung von *Histiostoma laboratorium* 75
III. Morphologie und Anatomie 75
A. Die äussere Gliederung 77
1. Metamerie 77
2. Dorsalseite 77
3. Ventralseite 78
4. Extremitäten des Podosomas 80
5. Gnathosoma 82
a) Präparationsmethoden 82
b) Aufbau 83
B. Die innere Gliederung 86
1. Untersuchungsmethoden 86
2. Die Körperwand 86
3. Das Endoskelett 87
4. Die Muskulatur 88
5. Das Nervensystem 88
6. Sinnesorgane 89
7. Das Verdauungssystem 90
a) Der Darmkanal 90
b) Der Fettkörper 95
8. Das Exkretionssystem 96
9. Die Oeldrüsen 97
10. Kreislauf- und Atmungssystem 98
11. Das Genitalsystem 98
a) Der weibliche Genitalapparat 98
b) Der männliche Genitalapparat 101
C. Unterschiede der Geschlechter 104
IV. Fortpflanzung und Ontogenese 105
A. Zuchtmethoden 105
1. Stammzuchten 105
2. Zuchtmedien für die Experimente 106
a) Einzelzuchten 106
b) Massenzuchten 107

[1] Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Hadorn danke ich bestens für die Überlassung des Themas sowie für sein grosses Interesse am Fortschreiten der Arbeiten und für seine mir dabei gewährte Unterstützung. Diese Arbeit wurde im Anatomischen Institut der Universität Zürich beendigt. Ich möchte daher auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. G. Töndury, Direktor des Anatomischen Institutes für sein wohlwollendes Entgegenkommen meinen besten Dank aussprechen.

3. Zuchttemperaturen 109
4. Materialgewinnung und Versuchskontrolle 109
B. Copula und Parthenogenese 110
C. Eigelege 112
D. Embryonalentwicklung 113
E. Postembryonale Entwicklung 114
1. Stadienfolge und Entwicklungszeit 114
2. Die heteromorphe Deutonymphe 118
a) Morphologie 118
b) Anatomie 120
c) Lebensweise 125
3. Häutungen 127
V. Die Geschlechtsbestimmung 129
VI. Beeinflussung der postembryonalen Entwicklung durch Aussenfaktoren 130
A. Die Entstehung der Deutonymphe 132
1. Der pH-Wert des Futters 132
2. Säuredämpfe 135
3. Zuckergehalt des Futters (Hypertonie) 135
4. Temperatur 136
5. Luftfeuchtigkeit 137
6. Futtermangel 138
7. Fäulnis- und Abbaustoffe 140
a) Faulhefe 140
b) Ammoniak 141
c) Milben-Press-Saft 142
B. Die Weiterentwicklung der Deutonymphe zur Tritonymphe 142
1. Feuchtigkeit 142
2. Futterqualität 144
3. Geruchliche Natur des Reizes 145
a) Chemotaxis-Versuche 146
b) Exstirpations-Versuche 148
c) Doppelring-Versuche 149
4. Weitere Analyse der auslösenden Stoffe 150
a) Der pH-Wert des Futters 150
b) Vitamin-Versuche 150
c) Stärke 152
C. Diskussion 152
VII. Die Bedeutung der Ventralorgane 157
A. Das Verhalten gegenüber Silbernitrat 157
B. Die Ventralringe als Organe der Osmoregulation 159
1. Fälle von extrarenaler Osmoregulation 159
2. Untersuchungen an *H. laboratorium* 160
a) Silbernitrat-Experimente 160
b) Chlorid-Experimente 160
c) Die Todesursache nach Silbernitratbehandlung 162
d) Organgrösse und Salzkonzentration 163
e) Zucker-Experimente 167
C. Der Imprägnationsvorgang 167
1. Der Einfluss des Lichtes 167
2. Oberflächliche Krustenbildung 168
3. Unentbehrlichkeit der Hypodermis 168
4. Diskussion 169
D. Zahl- und Lagevariationen der Ventralringe 170
E. Zusammenfassung 170
VIII. Bemerkungen zur Bekämpfung von Milbeninfektionen in Drosophilazuchten . . 171
IX. Zusammenfassung 172
X. Literaturverzeichnis 173

VOL. 35 1954

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.

In den Drosophilazuchten auf dem Standardfutter aus Agar, Mais, Zucker und Hefe treten immer wieder Milben auf, die, wenn sie in grossen Mengen vorhanden sind, auf die Zucht der *Drosophila*-Fliegen einen ungünstigen Einfluss ausüben. Es können in der Regel zwei Formen festgestellt werden, die sich in Gestalt, Färbung und Lebensweise stark unterscheiden. Die grössere, weissliche Form (Abb. 1 b) lebt ausschliesslich auf dem Futterboden. Die Lokomotionsbewegungen des plumpen Tieres sind recht träge. Diese Form soll im Folgenden vorläufig als „Futtermilbe" bezeichnet werden. Die kleine, braune und äusserst bewegliche Milbe (Abb. 1 a) ist meist in geringeren Mengen auf dem Futter, dagegen aber oft gehäuft am Glase der Zuchtflasche und am Watteprop zu finden. Da sie sich mit Vorliebe auch an die Fliegen festheftet, nennen wir sie bis auf weiteres „Drosophilamilbe". Der Gedanke liegt nahe, dass es sich bei dieser zweiten Form um einen Parasiten der *Drosophila* handelt, zumal die befallenen Fliegen nicht mehr dieselbe Lebhaftigkeit zeigen wie milbenfreie Tiere.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand ursprünglich darin, zu unter-

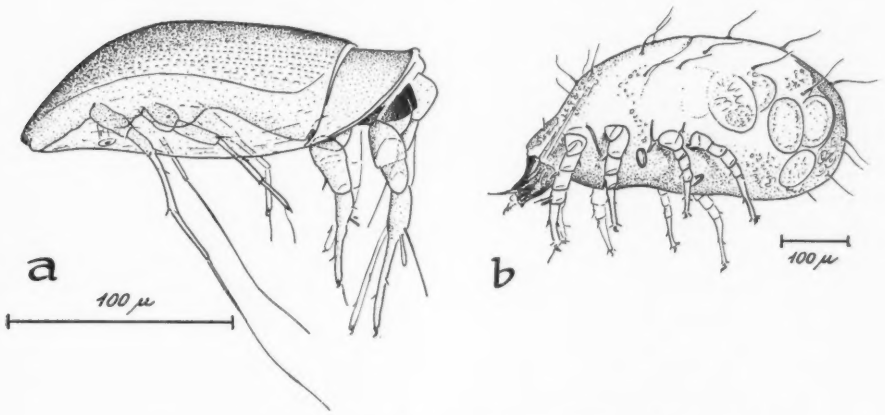


Abb. 1. a) „Drosophilamilbe", b) „Futtermilbe" in Seitenansicht.

suchen, ob die jederzeit in beliebigen Mengen zur Verfügung stehende „Futtermilbe" als neues Objekt für genetische Forschungen in Frage kommen könnte.

Bei dieser Milbe handelt es sich um die 1950 von HUGHES beschriebene Art *Histiostoma laboratorium*. Diese ist identisch mit der von STOLPE benannten Spezies *H. genetica*, über welche STOLPE 1938 im Anatomical Record 72 eine wenige Zeilen umfassende Mitteilung publiziert hat. Eine Diagnose wurde aber nicht veröffentlicht, so dass heute nur der Name *H. laboratorium* Hughes Gültigkeit besitzt.

Bereits 1946 hat HUGHES im *Drosophila* Information Service No. 20 eine kurze Mitteilung veröffentlicht, in welcher er einige Beobachtungen über Lebensweise und Entwicklung einer Milbe beschrieb, die in amerikanischen Genetiklaboratorien auftrat. Nach seiner Ansicht sollte es sich dabei um *H. genetica* handeln. Da zu jenem Zeitpunkt noch keine gültige Diagnose vorlag, konnte nicht entschieden werden, ob die uns in Zürich zur Verfügung stehende Milbe mit *H. genetica* identisch sei oder ob es sich um eine neue, noch unbeschriebene Art handle. Wegen dieser vorerst nicht zu behebenden Ungewissheit durfte nicht auf den Ergebnissen von HUGHES aufgebaut werden, sondern mussten diese erst durch eigene Untersuchungen verifiziert werden. Mit dem Fortschreiten der Arbeiten zeigte es sich bald, dass *H. laboratorium* trotz seines Namens kein befriedigendes Laboratoriumstier und für genetische Untersuchungen völlig ungeeignet ist.

VOL. 35 1954

An Stelle der ursprünglichen Fragestellung traten neue Probleme. So führt uns die Tatsache, dass arrhenotoke Parthenogenese vorliegt, bei welcher die Männchen aus unbefruchteten Eiern hervorgehen, zu der Frage nach dem Geschlechtsbestimmungsmodus. Liegt der DZIERZON'sche Mechanismus vor wie bei den Hymenopteren? Handelt es sich um haploide oder um diploide Parthenogenese? Wie liegen die chromosomalen Verhältnisse?

Wie sich bald zeigte, sind „Futtermilbe" und „Drosophilamilbe" identisch, d.h. sie gehören zur selben Spezies. Die „Drosophilamilbe" ist lediglich das zweite Nymphenstadium der „Futtermilbe". Dieses Jugendstadium wird aber nicht von allen Individuen durchlaufen. Zudem scheint das Auftreten der „Drosophilamilben" starken Schwankungen unterworfen zu sein. Die Fragen, die sich uns hier stellen, lauten: Warum durchlaufen nicht sämtliche Individuen das zweite Nymphenstadium? Was ist die Ursache für das zeitweise gehäufte Auftreten der „Drosophilamilben"?

H. laboratorium besitzt am Bauche zwei Paar ring- bis schuhsohlenförmige Cuticularstrukturen, die für die Unterfamilie der *Anoetinae* diagnostischen Wert besitzen, sonst aber als Strukturen unbekannter Funktion angesehen werden. Bestimmte Beobachtungen liessen vermuten, dass es sich dabei um

osmoregulatorische Organe handeln könnte. Diese Vermutung wurde experimentell geprüft.

Schliesslich wurde auch die in der Praxis wichtige Frage der Bekämpfungsmöglichkeiten bei Milbeninfektionen nicht aus dem Auge gelassen, ohne dabei aber auf systematischem Wege Bekämpfungsmethoden auszuarbeiten.

II. SYSTEMATISCHE STELLUNG VON *HISTIOSTOMA LABORATORIUM.*

Über die systematische Stellung von *H. laboratorium* gibt Tab. 1 Auskunft. Die Darstellung stützt sich auf das System der *Acari,* wie es VITZTHUM (1940/43) in „BRONNS Klassen und Ordnungen des Tierreichs" verwendet. Die Zusammenstellung soll keine Bestimmungstabelle sein, sondern nur einige der wichtigsten diagnostischen Merkmale anführen. Während *Acaridiae* und *Oribatei* die einzigen Untergruppen der *Sarcoptiformes* darstellen, sind die beiden angeführten Familien nur zwei Beispiele aus dem familienreichen Supercohors der *Acaridiae*. Desgleichen gehören zu den *Tyroglyphidae* ausser den *Anoetinae* und den *Tyroglyphinae* noch weitere Unterfamilien. *H. laboratorium* gehört in die gleiche Unterfamilie wie die bekannteren *Tyroglyphus farinae* (Mehlmilbe), *Tyrolichus casei* (Käsemilbe) und *Acarus siro* (Krätzmilbe). Es sind denn auch Vertreter aus dieser Gruppe, welche vereinzelt ebenfalls in Drosophilazuchten auftreten können, z.B. *Tyrolichus casei, Tyrophagus longior* u.a.

Das System der *Acari* ist mit einer unübersichtlichen Synonymik belastet, welche das an und für sich schon schwierige Bestimmen oft noch weiter erschwert. Nach VITZTHUM (1929) müsste die Gattung nicht *Histiostoma* Kramer 1876 sondern *Anoetus* Dujardin 1842 heissen. Wenn in dieser Arbeit der Name *Histiostoma* dennoch beibehalten wird, so geschieht das, um wenigstens für diese eine Art keine neue Wirrnis zu schaffen.

III. MORPHOLOGIE UND ANATOMIE.

Die Morphologie, d.h. die äussere Gliederung von *H. laboratorium* ist in der Diagnose dieser Milbe von HUGHES (1950) ausführlich dargestellt worden. Das erlaubt uns, hier auf eine eingehende Beschreibung zu verzichten und uns

Tab. 1. *Die systematische Stellung von H. laboratorium.*

Klasse	*Arachnoidea*					
Ordnung	*Acari*		Leach		(*Acarina*)	
Unterordnung	*Tetrapodili* Bremi Keine Stigmen Nur 2 Beinpaare	*Sarcoptiformes* Reuter Keine oder 8 podosomatale Stigmen	*Trombidiformes* Reuter 2 gnathosomatale Stigmen	*Parasitiformes* Reuter 2 prosomatale Stigmen	*Holothyroidea* Reuter 4 prosomatale Stigmen	*Notostigmata* With 8 opisthosomatale Stigmen Deutlich segmentiert
Supercohors		*Acaridiae* Latreille Ohne Stigmen Weichhäutig			*Oribatiæ* Oudemans Mit Stigmen Gepanzert	
Familie		*Tyroglyphidae* Donnadieu Cheliceren meist scherenförmig			*Acaridae* Claus Hautparasiten (Krätzmilben)	
Unterfamilie		*Anoetinae* Oudemans Adulti ventral mit zwei Paar rundlichen Chitinstrukturen. Cheliceren nicht scherenförmig, mit nur einem sägeartigen Digitus. Tarsus ohne Haftlappen, nur mit ungestielter Kralle.			*Tyroglyphinae* Oudemans z. B. Tyroglyphus farinae (L) (Mehlmilbe)	
Gattung		*Histiostoma* Kramer (= *Anoetus* Dujardin)				
Art		*Histiostoma laboratorium* Hughes 1950				

VOL. 35 1954

auf das zu beschränken, was im Rahmen dieser Arbeit unerlässlich erscheint oder einer Präzisierung bedarf.

Die Anatomie, d.h. die innere Gliederung wurde nicht systematisch studiert, sondern nur soweit analysiert, als für die Vorstudien zu cytologischen Untersuchungen notwendig war. Es haben sich dabei keine Unterschiede zu der Beschreibung der Anatomie der *Acaridiae* ergeben, wie sie VITZTHUM (1940/43), REUTER (1909) u.a. bieten. Ausserdem stimmen die anatomischen Verhältnisse überraschend gut mit denjenigen von *Glycyphagus domesticus* de Geer überein (T. E. HUGHES und A. M. HUGHES 1938). Aus diesem Grund sollen auch bei der inneren Gliederung nur diejenigen Feststellungen erwähnt werden, welche zum Verständnis des experimentellen Teiles notwendig sind oder aber zur Ergänzung der Kenntnisse der Anatomie der *Sarcoptiformes* und speziell der *Acaridiae* beitragen können.

A. DIE ÄUSSERE GLIEDERUNG.

1. Metamerie.

Von der bei allen Arthropoden auftretenden Metamerie ist bei den Milben nur wenig zu erkennen. Während z.B. bei den *Notostigmata, Tarsonemini* (*Trombidiformes*) u.a. durch das Vorhandensein von Rücken- und vor allem Bauchschildern noch eine Metamerie festgestellt werden kann, ist bei den *Acaridiae* nichts Derartiges mehr vorhanden. Nur eine bei den meisten *Acari* mehr oder weniger deutlich auftretende Querfurche kann als Rest einer ursprünglichen Segmentierung aufgefasst werden. Diese Furche kann verschiedene Lage haben, doch befindet sie sich meistens — so auch bei *H. laboratorium* — zwischen dem zweiten und dritten Beinpaar. Benennungen wie Cephalothorax und Abdomen entsprechen hier nicht den bei Arthropoden üblichen Bezeichnungen. Von BÖRNER (1904) und REUTER (1909) wurden deshalb für die einzelnen Körperabschnitte neue Termini eingeführt. Es ist dies zudem ein Ausdruck für die Sonderstellung, welche die *Acari* innerhalb des Systems der Arthropoden einnehmen. Abb. 2 veranschaulicht die heute gültige Nomenklatur.

2. Dorsalseite (Abb. 3b; 4b).

Die Tiere erscheinen bei auffallendem Lichte weisslich. Bei reichlichem Futterangebot können sie auch eine leicht gelbliche Färbung annehmen. Das beruht nicht auf einer entsprechenden Pigmentierung, sondern darauf, dass die Cuticula durchsichtig ist und die Guaninkristalle der ausgedehnten Speicherniere (S. 96) sowie den verschieden stark ausgebildeten Fettkörper durchscheinen

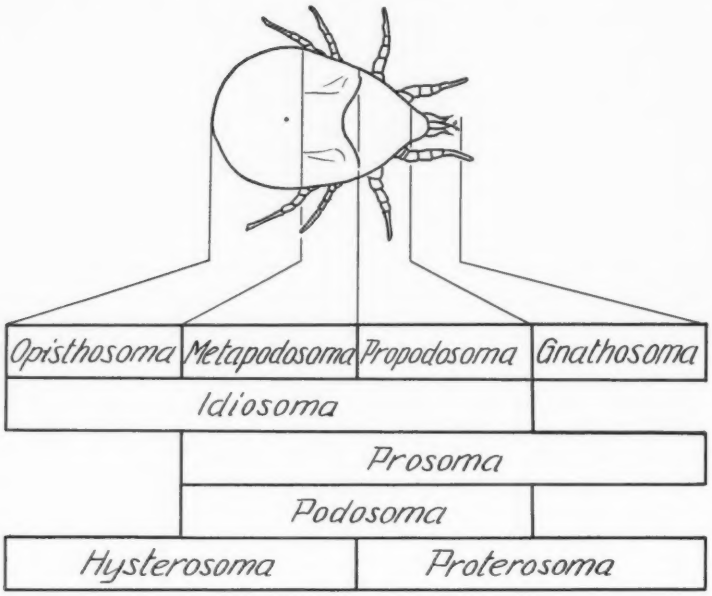


Abb. 2. Die Körpergliederung der Milben.

VOL. 35 1954

lässt (S. 95). Nur dort, wo Guanin und Fettkörper fehlen, erscheint das Tier dunkel.

Ausser der bereits erwähnten Querfurche und einer grösseren Zahl mittellanger, schlanker, ungefiederter Borsten (S. 89) finden sich bei vielen, aber nicht bei allen Tieren unter der Cuticula des Opisthosomas zwei gelblich-grün gefärbte Blasen, die sog. Oeldrüsen (S. 97). Zwischen diesen Drüsen liegt beim Weibchen auf der Medianlinie der unscheinbare, leicht zu übersehende Kopulationsporus (S. 99; Abb. 22).

Viel auffallender als die eben erwähnten oberflächlichen Einrichtungen sind die durchscheinenden Teile der inneren Organe, hauptsächlich verschiedene Teile des Verdauungsapparates und beim Weibchen vor allem die grossen, bereits Embryonen enthaltenden Eier im Ovidukt sowie die am caudalen Körperpol befindlichen, mit durchsichtigen Eiern angefüllten Ovarien.

3. Ventralseite (Abb. 3a; 4a).

Die Ventralseite besitzt sechs Paar äusserst feine, kleine Börstchen, die vielleicht besser als Dörnchen bezeichnet werden. Diese sind so fein, dass sie nur mit grösster Mühe gefunden werden können. Ebenfalls schwierig zu sehen ist die in der Literatur als „Vulva" bezeichnete Oeffnung der „Vagina", ein quergestellter Schlitz auf Höhe der cranialen Coxalleisten (Epimeron, s.u.)

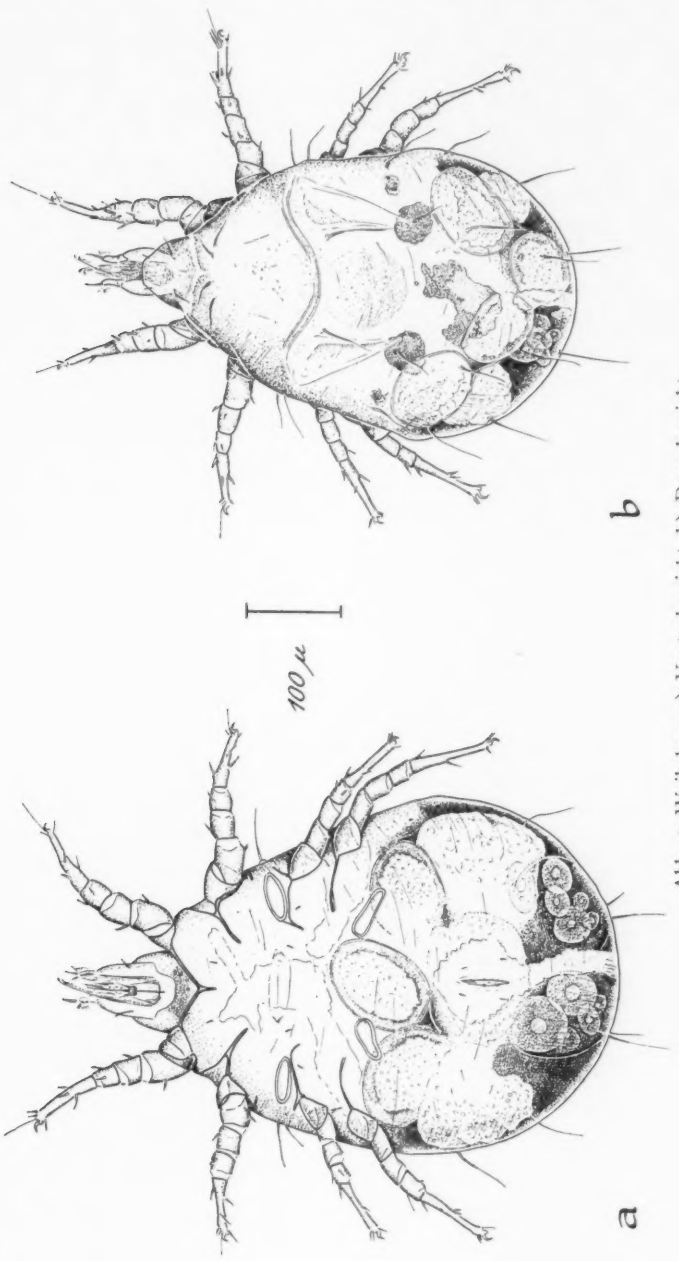


Abb. 3. Weibchen. a) Ventralansicht, b) Dorsalansicht.

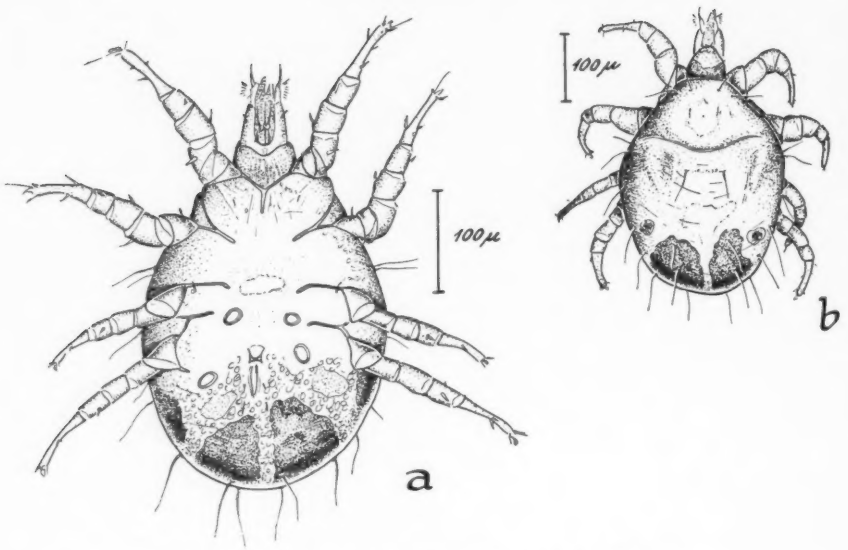


Abb. 4. Männchen. a) Ventralansicht, b) Dorsalansicht.

VOL. 35 1954

des dritten Beinpaares, der seiner Funktion entsprechend besser als Tokostom (Eilegeöffnung) bezeichnet wird (S. 99). Der Verdauungstraktus endet auf der Unterseite des Opisthosomas in einem längsgestellten Afterspalt. Am auffallendsten jedoch sind die paarig angeordneten, für die Unterfamilie der *Anoetinae* charakteristischen Chitinstrukturen. Es handelt sich dabei um Chitinwälle von schuhsohlenförmiger, ovaler, ringförmiger oder dreieckiger Gestalt. Beim Weibchen (Abb. 3 a) befinden sich die schuhsohlenförmigen „Ventralringe" des vorderen Paares unmittelbar vor Epimeron III, die meist ringförmigen oder dreieckigen „Ringe" des hinteren Paares mediocaudal der Coxae IV. Beim Männchen (Abb. 4 a) werden in der Regel die hinteren und die vorderen Chitinwälle ringförmig ausgebildet. Das vordere Paar ist mediocaudal verschoben, sodass diese beiden Ringe auf Höhe von Epimeron IV zu liegen kommen. Während beim Weibchen die Ringe des caudalen Paares näher beisammenliegen, sind es beim Männchen diejenigen des cranialen Paares.

Ferner wird auf der Ventralseite durch Cuticularleisten, die am Grunde der Extremitäten entspringen, ein charakteristisches Muster geprägt. Da diese Leisten zum Skelett der Beine gehören, sollen sie im folgenden Abschnitt behandelt werden.

4. Extremitäten des Podosomas.

Mit Ausnahme der *Tetrapodili* besitzen alle Milben im adulten Zustande vier Beinpaare. Die Larve, das erste postembryonale Stadium, zeigt nur deren drei.

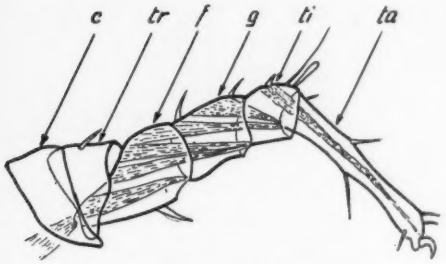


Abb. 5. Gliederung der Schreitextremität. *c* Coxa, *tr* Trochanter, *f* Femur, *g* Genu (Patella), *ti* Tibia, *ta* Tarsus.

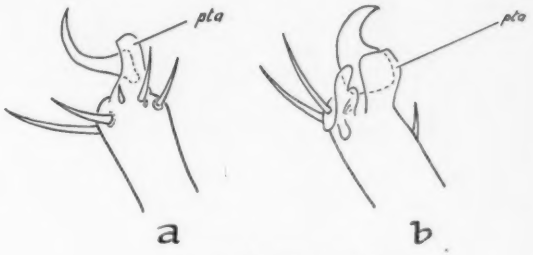


Abb. 6. Krallen der Beine IV. a) Weibchen, b) Männchen. *pta* Praetarsus.

Die Beine weisen sechs Glieder auf, von denen die fünf distalen als echte Glieder zu bezeichnen sind, d.h. letztere sind durch synarthrodiale Membranen mehr oder weniger gelenkig miteinander verbunden. Von proximal nach distal unterscheiden wir Coxa, Trochanter, Femur, Patella (Genu), Tibia und Tarsus (Abb. 5). Die Beweglichkeit der einzelnen Gelenke ist sehr verschieden. Am grössten ist sie zwischen Trochanter und Coxa, sowie zwischen Trochanter und Femur, während sie im Tibiotarsalgelenk bereits etwas vermindert erscheint. Femur und Patella sind gegeneinander nur wenig beweglich. Die Patella wird hauptsächlich durch den Muskel, der zur Tibia führt, bewegt, indem bei fortgesetzter Kontraktion dieses Muskels das schon maximal gebogene Tibialglied einen einseitigen Druck auf die Patella ausübt. Dies tritt sehr bald ein, da die Beweglichkeit des Tibiopatellargelenkes ebenfalls klein ist.

Die Coxae sind weitgehend in den Rumpf eingesenkt und unbeweglich. Trotzdem bleibt das Glied als morphologische Einheit erhalten. Die Seitenwände der Coxae bilden nämlich die sogenannten Apodemata, d.h. Cuticularleisten, die ins Körperinnere vorragen und als Teile des Endoskelettes dem Muskelansatz dienen (S. 87). Die craniale Wand oder Epimeron ist stärker ausgebildet als die caudale Wand oder Epimerit. Die Apodemata bilden ein charakteristisches Muster, das in der Systematik verwendet wird.

Bei den *Acari* muss ein tridactyler Tarsus als ursprünglich angenommen werden. Die *Sarcoptiformes* sind infolge Reduktion der beiden äusseren Krallen monodactyl geworden. Alle Tarsalanhänge, also auch die Krallen, entstehen ontogenetisch indem das dazu benötigte Material aus der embryonalen Tarsusspitze herausgepresst wird. Ausser der Kralle entsteht mindestens noch eine dünne Membran, welche die Beweglichkeit der ersteren ermöglicht. Aus diesem Material können aber noch weitere Gebilde hervor gehen, ja, es kann zur Bildung eines eigentlichen Praetarsus kommen, der dann erst die Kralle trägt. Bei *H. laboratorium* muss das manschettenartige Gebilde am Grunde

der Kralle als P r a e t a r s u s bezeichnet werden (Abb. 6). Die Endkralle selbst ist schwach beweglich.

5. G n a t h o s o m a.

Die Untersuchung des Gnathosomas, desjenigen Körperabschnittes, der im wesentlichen von den Mundgliedmassen aufgebaut wird, ist bei *H. laboratorium* und bei den *Acaridiae* im allgemeinen mit grossen Schwierigkeiten verbunden. Erstens handelt es sich um ein kleines, 1/10 mm kaum übersteigendes Gebilde. Zweitens liegen sehr spezialisierte Verhältnisse vor, sodass infolge von Reduktionen, Verschmelzungen und Aufteilungen vom ursprünglichen Bauplan nicht mehr viel zu erkennen ist. Drittens sind alle Bestandteile nur schwach chitinisiert und farblos, sodass das Erkennen und einwandfreie Abgrenzen der einzelnen Teile ungemein erschwert wird.

a) *Präparationsmethoden.*

Aus den oben angeführten Gründen genügen einfache Deckglaspräparate für die Untersuchung nicht. Um dennoch zu einem Ziele zu gelangen, wurden folgende Methoden verwendet.

1. *Beobachtungen am lebenden Tier:* Das Studium der bewegten Mundgliedmassen ermöglicht in manchen Fällen ein Erkennen einzelner Teile, vor allem der Cheliceren. Die Geschwindigkeit der Bewegungen ist aber so gross, dass Einzelheiten nicht festgestellt werden können.

2. *Quetschpräparate:* Durch Quetschen und Zerreiben unter dem Deckglas wurde versucht, die stark ineinander verzahnten Teile des Gnathosomas voneinander zu trennen. Selbst an gut mazeriertem Material kommt es aber nur zu einer ungenügenden Isolierung.

3. *Chemische Beeinflussung:* Mit Essigsäure konnte am lebenden Tier ein Spreizen der Mundgliedmassen erzielt werden, wovon aber nur die linke und rechte Hälfte als Ganzes erfasst wurden.

4. *Chitinfärbungen:* Die gebräuchlichen Chitinfärbungen führen nicht zum Ziele, weil dabei sämtliche Teile des Gnathosomas angefärbt werden, so dass an Stelle der beinahe vollständigen Durchsichtigkeit eine allgemeine Farbtönung ohne weitere Differenzierung tritt.

5. *Sektion des mazerierten Ganthosomas:* Die Mazeration mit Kalilauge ist ungeeignet, da die durch die Lauge herausgelösten Weichteile als feine Verunreinigungen am Gnathosoma hängen bleiben und eine Deutung der Strukturen erschweren. Mazeration in heisser Milchsäure ergibt völlig saubere Präparate. Das abgetrennte, mazerierte Gnathosoma wird dann in Glycerin mit feinsten Minutienstahlnadeln soweit als möglich seziert oder wenigstens in seinem Zusammenhange gelockert. Selbst bei äusserster Sorgfalt können die Einzelteile nicht als Ganzes isoliert werden. Durch leichten Druck auf das Deckglas können die gelockerten Teile oft noch weiter getrennt werden. Befriedigende Ergebnisse lassen sich aber trotzdem nicht erzielen.

6. *Phasenkontrast-Mikroskopie:* Die nach Punkt 5 hergestellten Präparate lassen im gewöhnlichen Lichtmikroskop nicht viel erkennen, da keine genügende Differenzierung zustande kommt. Das Phasenkontrastmikroskop ermöglicht, wenigstens einen Wirrwarr von Konturlinien wahrzunehmen, dessen Deutung nur durch ständigen Vergleich mit den bewegten Mundgliedmassen am lebenden Objekt zum Teil ermöglicht wird.

VOL. 35 1954

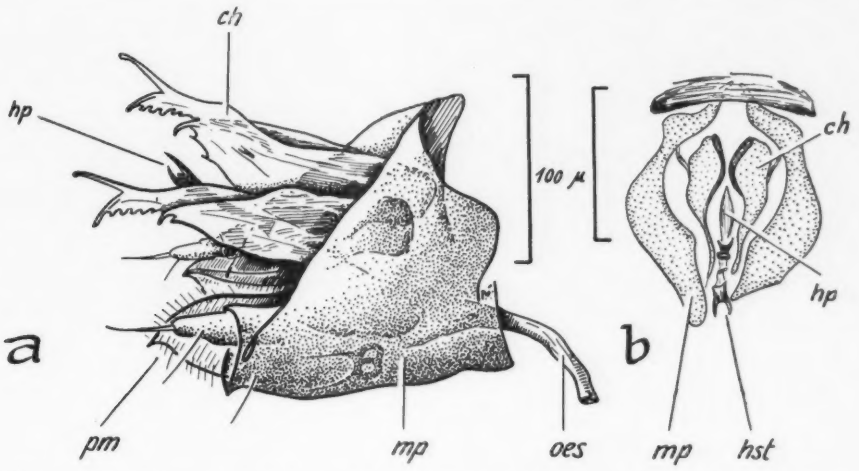


Abb. 7. Gnathosoma. a) Seitenansicht, b) Transversalschnitt. *ch* Chelicere, *hp* Hypopharynx, *hst* Hypostom, *oes* Oesophagus, *mp* Maxillipalpus, *pm* Palpmembran.

b) *Aufbau.*

Im Prinzip wird das Gnathosoma der *Sarcoptiformes* aus folgenden Teilen aufgebaut (Abb. 7a): Die Maxillipalpen bilden den grössten Teil der lateralen und ventralen Begrenzung des Ganthosomas. Zusammen mit dem mit ihnen verwachsenen Hypostom bilden sie eine nach dorsal durch einen Schlitz geöffnete Röhre, in welcher die beiden beweglichen Cheliceren, der unbewegliche, unpaare, lanzett- oder zungenförmige Hypopharynx und oft noch eine Vielfalt anderer Mundteile liegen (VITZTHUM 1940/43). Wahrscheinlich ist die Verwachsung zwischen Maxillipalpen und Hypostom nicht sehr stark, denn sonst könnte am lebenden Tier durch Essigsäure nicht eine Trennung beider Gnathosomahälften erzwungen werden.

a) Cheliceren.

Die Cheliceren sind bei den Milben als Scheren ausgebildet, indem analog den Scherenbildungen der Crustaceen das letzte Glied (Tarsus) auf die ventrale Seite der Tibia zurückverlagert und dort als Digitus mobilis gelenkig eingesetzt worden ist. Verschwindet sekundär eines der Scherenglieder, dann ist es in der Regel der Digitus fixus. Nur bei den *Anoetinae* wird der Digitus mobilis von der Reduktion erfasst, während der Digitus fixus zu einem Bohrstachel, der auf der Ventralseite sägeartig mit Zähnen versehen ist, umgewandelt wird (Abb. 8). Bei *Cederhjelmia* (*Anoetinae*) ist der Digitus mobilis als Rudiment noch vorhanden, ebenfalls in Form einer Säge, deren Zähne aber nicht gegen den Digitus fixus sondern auch nach ventral gerichtet sind. Die Cheliceren von *H. laboratorium* (Abb. 8a dm) besitzt proximal von der

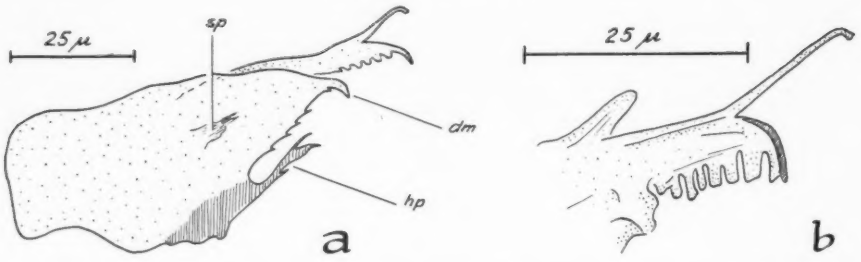


Abb. 8. a) isolierte Chelicere, b) distales Ende der Chelicere. *dm* rudimentärer Digitus mobilis, *hp* anhängender Hypopharynx, *sp* spaltförmige Grube.

gut ausgebildeten Säge ein deutliches, mit seinen Zacken ventralwärts gerichtetes Anhängsel, das ein entsprechendes Rudiment des Digitus mobilis sein könnte.

Ausser dem dorsal gelegenen, nach vorn gerichteten Bohrstachel und dem markanten Endhaken treten meist sechs, in einigen Fällen auch sieben Zähnchen auf. HUGHES (1950) vermutet, dass das feine Knöpfchen am Ende des Bohrstachels ein Sinnesorgan sein könnte (S. 90). Bei der medial gelegenen, gruben- oder spaltförmigen Struktur (Abb. 8 a sp) handelt es sich vielleicht um ein sog. Spaltorgan (S. 125).

VOL.
35
1954

β) Maxillipalpen (Pedipalpen).

Die Maxillipalpen sind ursprünglich wie die Laufextremitäten sechsgliederig. Die Coxae bilden dabei den Hauptbestandteil der Gnathosomabasis, die an ihrer Aussenseite einen Sockel (Palparium) bildet, dem sich die anderen Palpenglieder anfügen. Bei vielen Milben kommt es zu einer Aufteilung in eine Aussen- und eine Innenlade (Mala externa et interna).

Bei den *Acaridiae* sind noch weitere proximale Glieder zur Bildung des Palpariums heran gezogen worden, sodass nur noch zwei bewegliche Glieder bleiben. Die Pedipalpen besitzen somit drei Glieder, deren Grenzen allerdings oft schwierig zu sehen sind. Bei *H. laboratorium* trägt das vorderste Glied eine starke und eine lateral gelegene, schwächere Borste (Abb. 10). Das zweite Glied besitzt auf der Dorsalseite eine kleine Borste, das dritte Glied (Palparium) eine ebensolche auf der Ventralseite.

Ein medial neben den Maxillipalpen gelegenes, lanzettähnliches, mit langen, feinen Haaren besetztes, membranöses Gebilde konnte nicht eindeutig analysiert werden und lässt darum zwei Deutungen zu:

1) Es stellt eine umgewandelte Mala interna dar. Die Mala externa bildet den Palpus (Abb. 9 a—d). Aehnliche Umwandlungen treten bei *Parasitiformes* und vogelepizoischen *Acaridiae* auf.

2) Das Gebilde entspricht der Palpmembran bei *Acarus*. Es handelt sich dabei um eine blattartige Verbreiterung der Palpenglieder, wie sie auch bei

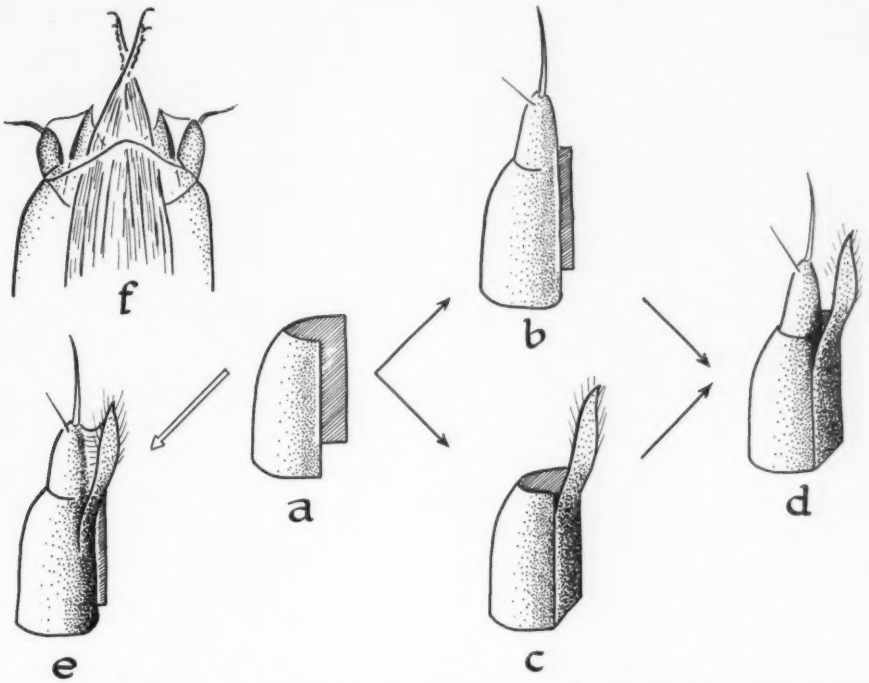


Abb. 9. Schematische Deutung der Blattmembran des Maxillipalpus als Mala interna (a-d) und als Palpmembran (e). f) Ventralansicht des Gnathosomas; die Verbindung zwischen Membran und Palpus spricht für die Deutung (e).

anderen *Anoetinae*, z.B. *H. feroniarum* Dufour gefunden werden (Abb. 9 e). Die in Abb. 9 f dargestellte Beobachtung spricht für eine solche Deutung.

γ) Übrige Strukturen.

Bei dem unpaaren, zungenförmigen Gebilde, das in Abb. 8 a an der isolierten Chelicere hängt, handelt es sich wahrscheinlich um den Hypopharynx. Eine definitive Entscheidung darüber ist aber nicht möglich, da die Zusammenhänge mit den übrigen Bestandteilen im Innern der Gnathosomabasis nicht aufgedeckt werden konnten.

Im Innern des Gnathosomas, besonders beim Übergang zum Podosoma befinden sich noch weitere, komplizierte Chitinstrukturen wie Ringe, Spangen usw. (Abb. 10), die an der Mund und Schlundbildung beteiligt sind und z.T. als Ansatz für die Pharynxdilatatoren dienen (Abb. 14). Eine weitergehende Analyse dieser räumlichen Gebilde wurde nicht durchgeführt.

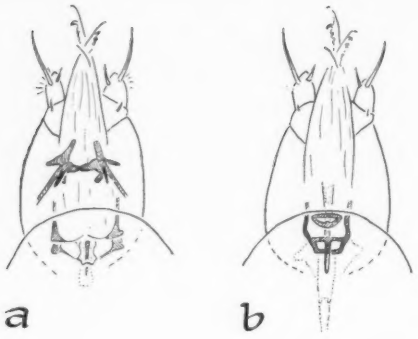


Abb. 10. Chitinstrukturen des Mundes und des Schlundes. a) dorsal gelegene, b) ventral gelegene Teile.

B. DIE INNERE GLIEDERUNG.

1. Untersuchungsmethoden.

1. *Untersuchungen am lebenden Tier:* An Einzelheiten sind lediglich sichtbar: Abschnitte des Oviduktes, Teile des Verdauungstraktus, Oeldrüsen, einzelne Muskelbündel und eventuell das Ovar. Der Vorteil, den die Durchsichtigkeit der Cuticula bietet, wird durch die relative Dicke des Objektes und vor allem durch den Fettkörper und die undurchsichtige Speicherniere (Guaninkristalle) wieder aufgehoben.

2. *Vitalfärbungen* können diese Schwierigkeit zum Teil beheben. Durch direkte Einwirkung oder durch Verfüttern von Neutralrot, Methylenblau, Toluidinblau, Bismarckbraun, Alizarin, Sudan III, Scharlach, sowie durch altes, von den Zersetzungsprodukten braun gefärbtes *Drosophila*-Standard-Futter gelangen Anfärbungen des Darmkanales und des Fettkörpers.

3. *Aufhellungspräparate:* Aufhellung in kalter Milchsäure, Cedernöl, Nelkenöl und Xylol brachten nicht die erwarteten Verbesserungen. Auch das Herauslösen des Guanins am Totalpräparat mit verdünnten Laugen führt nicht zum Ziel, weil gleichzeitig auch die zarten Organe angegriffen werden. Dagegen kann auf Schnittpräparaten mit n-HCl das Guanin entfernt werden.

4. *Schnittpräparate:* Fixiert wurde mit Carnoy, Bouin, Bouin-Allan kalt und warm, Champy und Zenker. Enthärten des Chitins in Diaphanol ist nicht unbedingt notwendig. Über die aufsteigende Alkoholreihe mit Stufen von je 10 % und über Methylbenzoat-Benzol wurde in Paraffin eingebettet. Folgende Farbreaktionen kamen zur Anwendung: Haematoxylin-Eosin; Gallaminblau mit Kernechtrot bzw. Lichtgrün als Gegenfärbung; Ehrlichs Haematoxylin; Feulgen. Als Schnittdicke wurde 4—5 μ gewählt, weil anhand dieser Schnitte die Chromosomenverhältnisse der sehr kleinen Kerne untersucht werden sollten. Es hat sich gezeigt, dass für topographisch-anatomische Untersuchungen dickere Schnitte besser geeignet sind.

2. Die Körperwand.

Das Integument besteht aus der Hypodermis und der von ihr ausgeschiedenen Cuticula. Sie umgibt das Körperinnere, das zusammengesetzt ist aus einem sehr lockeren, parenchymatischen Gewebe von netzartigem Aussehen und den darin eingelagerten Eingeweiden.

Von der Hypodermis konnten auf den Schnitten nur vereinzelte und undeut-

VOL. 35 1954

liche Zellen gesehen werden. Das stimmt mit den Befunden an anderen Tyroglyphiden überein. Bei diesen wird die Hypodermis nach der Cuticula-Absonderung weitgehend zurückgebildet. Es bleiben nur noch wenige Zellen übrig, die sich vom anschliessenden Parenchym kaum unterscheiden lassen und bei starker Spannung des Integumentes, wie es z.B. bei trächtigen Weibchen auftritt, so stark auseinandergezogen und abgeplattet werden, dass sie überhaupt nicht mehr gesehen werden können. Die wenigen übrig gebliebenen Zellen bilden kurz vor der nächsten Häutung eine neue, vollständige Hypodermis, die ihrerseits die neue Cuticula absondert.

Die Cuticula ist dünn, durchsichtig, völlig glatt und dehnbar. Nur die steifen Beinglieder, Teile des Gnathosomas und die Ventralringe bilden eine Ausnahme. Diese besitzen eine dickere Cuticula, was sich auch durch ihre hellbraune Farbe dokumentiert. Allerdings soll nach NALEPA (1884/85) diese Färbung nicht nur durch die Eigenfarbe des Chitins, sondern zum Teil auch durch eingelagerte Farbstoffe bedingt sein.

Auf eine Darstellung der Haare und Borsten, insbesonders auf eine Benennung nach der Nomenklatur von OUDEMANS (cit. n. VITZTHUM 1940/43) soll hier verzichtet werden. Über Zahl und Anordnung orientieren die vorzüglichen Umrisszeichnungen von HUGHES (1950). Lediglich eine Spezialausbildung der Haare, die sogenannten Solenidien sollen im Abschnitt über die Sinnesorgane noch zur Sprache kommen (S. 89; 123).

Ausser diesen markanten und in bestimmter Zahl vorhandenen Haaren finden sich bei der Larve am ganzen Körper sehr viele feinste Haare (Abb. 30 a). In einem einzigen Fall wurden entsprechende „Lanugo"-Haare auch bei einer Tritonymphe von H. laboratorium gefunden.

3. Das Endoskelett.

Ausser dem Exoskelett der Cuticula weist *H. laboratorium* Einrichtungen auf, die bereits als Endoskelett bezeichnet werden dürfen. Die Cuticula der Beinglieder ist genügend stark, um ihrer Funktion als Widerlager der Muskulatur vollauf zu genügen. Das weiche und dehnbare Integument des Körpers aber bietet den Muskelansätzen zu wenig Widerstand und wird durch das Endoskelett teils unterstützt, teils ersetzt. Es besteht im wesentlichen aus den Apodemen und einem Endosternit.

Die Apodemen sind die Seitenwände der in den Körper fest eingebauten Coxalglieder der Schreitextremitäten (S. 81). Sie bilden mehr oder weniger weit ins Körperinnere vorragende Leisten. Die Epimeren der Coxae I vereinigen sich in der Medianlinie und bilden ein kurzes, caudalwärts gerichtetes „Sternum". Zur entsprechenden Bildung eines cranialwärts gerichteten „Ventrums" auf dem Metapodosoma kommt es bei *H. laboratorium* nicht (vgl. S. 118).

Wenn auch die Apodemen immer noch zum Exoskelett gerechnet werden

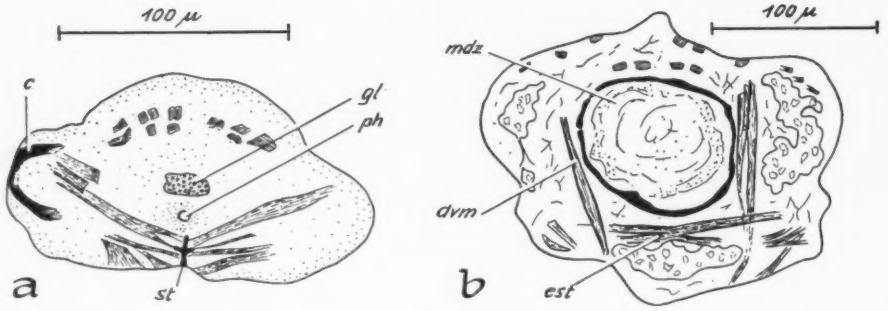


Abb. 11. Endoskelett. Transversalschnitte. a) Sternum mit Muskelansätzen, b) Endosternit (Sehnenplatte). *c* Coxa, *dvm* dorsoventrale Muskeln, *est* Endosternit, *gl* Ganglion, *mdz* zentraler Mitteldarmabschnitt, *ph* Pharynx, *st* Sternum.

könnten, so trifft das für den Endosterniten nicht mehr zu. Ein solcher ist von den verwandten Tyroglyphiden bekannt und wird wegen der Übereinstimmung der Anatomie aller *Sarcoptiformes* auch für die anderen Gattungen der *Acaridiae* angenommen. Es handelt sich dabei nicht um ein eigentliches Hartgebilde, sondern um eine Art „Sehnenplatte", welche im vorderen Teil des Podosomas schwebt und von den an ihr entspringenden Extremitätenmuskeln in Spannung gehalten wird. Bei *H. laboratorium* kann am lebenden Tier deutlich der Vorderrand einer beweglichen Sehnenplatte beobachtet werden, der dem Ansatz von Bein- und Kopfmuskeln dient. Die caudalen Teile des Endosterniten sind unter den umfangreichen Mitteldarm verlagert und entziehen sich der direkten Beobachtung. Auf Schnittpräparaten lässt sich aber ohne weiteres das Auseinanderstrahlen der Muskelzüge erkennen (Abb. 11; 24c). Es darf daher als sicher angenommen werden, dass mindestens die *Anoetinae* die postulierte Sehnenplatte besitzen.

In diesem Zusammenhang soll noch auf zwei paramedian gelegene Eindellungen hingewiesen werden, welche *H. laboratorium* auf der Dorsalseite des Metapodosomas aufweist. Es sind das Stellen, die dorsoventralen Muskeln als Ursprung dienen ohne aber besondere, den Apodemen vergleichbare Vorsprünge zu besitzen.

4. Die Muskulatur.

Die Anordnung der Muskelzüge stimmt bei allen bisher untersuchten Tyroglyphiden überein. Es sei deshalb auf die ausführliche Darstellung der Verhältnisse bei *Glycyphagus domesticus* de Geer von T. E. Hughes und A. M. Hughes (1938) verwiesen.

5. Das Nervensystem.

Bei den Milben ist das Nervensystem maximal konzentriert; es wird aber embryonal wenigstens zum Teil noch segmental angelegt. Im adulten Zustand

VOL. 35 1954

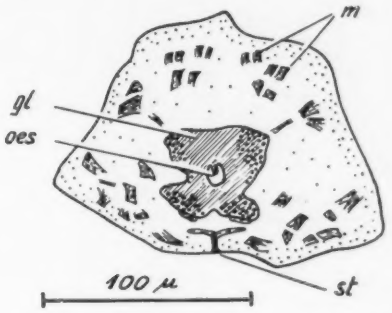


Abb. 12. Transversalschnitt durch Oesophagus (*oes*) und Schlundganglion (*gl*). *m* Muskulatur, *st* Sternum.

beschränkt es sich aber auf eine den Oesophagus umfassende Masse und die von ihr entspringenden Nerven. Unter den *Acaridiae* sind nur die Verhältnisse weniger Tyroglyphiden bekannt.

Die ursprüngliche Zusammensetzung der Ganglienmasse aus Oberschlund- und Unterschlundganglion wird bei *H. laboratorium* an der Stelle, wo sie vom Oesophagus durchbohrt wird, durch eine laterale Einkerbung angedeutet (Abb. 12). Das Unterschlundganglion reicht unter dem Mitteldarm ziemlich weit, bis auf Höhe des zweiten Beinpaares caudalwärts. Die ganze Ganglienmasse besteht aus einem zentralen, faserigen Mark und der die Ganglienzellkörper enthaltenden Rinde. Diese umfasst das Mark mit Ausnahme der gegen den Mitteldarm gerichteten dorsocaudalen Fläche auf allen Seiten (Abb. 12; 14a). Nach NALEPA (1884) soll bei den Tyroglyphiden die Rindenschicht nur eine Zellage umfassen. Bei *H. laboratorium* sind es aber sicher deren mehrere. Einige sehr feine, wegziehende Nervenfasern konnten festgestellt werden.

6. Sinnesorgane.

Bei den Adulti von *H. laboratorium* konnte in Bezug auf Sinnesorgane nur wenig festgestellt werden. Für die Milben wird angenommen (VITZTHUM 1940/43), dass alle Haargebilde mit einer Sinnesfunktion in Verbindung stehen. Der Nachweis, was für eine Sinnesfunktion bei den einzelnen Haaren vorliegt, ist aber meistens sehr schwierig wenn nicht sogar unmöglich. Am einleuchtensten ist die Zugehörigkeit von Haaren zum Tastsinn. Dieser kommt aber aus verschiedenen Gründen, die hier nicht erläutert werden sollen, für einzelne Haartypen nicht in Frage. Die Einteilung der Haargebilde der *Acari* beruht daher weniger auf deren Funktion als vielmehr auf ihrem Aufbau und ihrem Gehalt an verschiedenen Cuticulasorten. So wird dem isotropen, gewöhnlichen „Chitin" das doppeltlichtbrechende „Actinochitin" gegenübergestellt. Von den verschiedenen Haartypen sollen hier nur die Solenidien zur Sprache kommen, welche kein Actinochitin besitzen und in der Längsrichtung von einem Kanal durchzogen werden, der mit Plasma erfüllt ist und mit dem peripheren Nervensystem in Verbindung stehen soll. Die äussere Gestalt kann

verschieden sein, weist aber häufig die Form eines Kolbens oder Zapfens auf. *H. laboratorium* besitzt auf der Tibia I und auf dem Tarsus II je einen solchen Zapfen, der als Organ des Geruchssinnes zu bezeichnen ist. Die Deutonymphen zeigen das gleiche Organ in ausgeprägterer Ausbildung. Da dieser Kolben bei unseren experimentellen Untersuchungen der Deutonymphe eine Rolle spielt, soll eine eingehendere Besprechung erst bei der Behandlung der Anatomie dieses Jugendstadiums erfolgen (S. 123). An dieser Stelle sei lediglich erwähnt, dass durch chemotaktische Versuche ein Geruchssinn bei den Adulti tatsächlich nachgewiesen wurde (Abb. 48 c, d).

Deutlich ausgeprägte Organe, die dem Lichtsinn zuzuordnen wären, besitzt *H. laboratorium* wie die meisten *Sarcoptiformes* im ausgewachsenen Zustande nicht. Allerdings gibt es gerade unter den Tyroglyphiden, zu denen auch *Histiostoma* gehört, einige Ausnahmen. Es überrascht deshalb nicht, dass die Deutonymphe von *H. laboratorium* einen ausgesprochenen Lichtsinn besitzt (S. 123). Allerdings fehlt auch den Adulti und den anderen Jugendstadien der Lichtsinn nicht gänzlich. Nähern wir ihnen nämlich die Spitze einer sauberen Nadel oder einer feinen Pinzette auf 1—3 mm, so weichen sie häufig vor dieser zurück. Ein Helligkeitssehen, ev. ein schwaches Richtungssehen ist sicher vorhanden, doch ist es zu schwach ausgeprägt, um als Grundlage für irgend welche Taxien zu dienen. Offenbar wirkt das Licht durch das dünne Integument hindurch direkt auf das Oberschlundganglion. Das ist auch von vielen anderen Milben bekannt, die im Falle starker Panzerung über dem „Gehirn" verdünnte, durchsichtige Stellen des Integumentes aufweisen.

Der Geschmacksinn ist sicher vorhanden und wahrscheinlich irgendwo im Gnathosoma lokalisiert. Die ständig herummarschierenden Tiere setzen von Zeit zu Zeit ihre Cheliceren in raspelnde Bewegung, auch wenn kein Futter vorhanden ist. Sie vermögen schon nach wenigen Chelicerenbewegungen alte und frische Hefe zu unterscheiden. Es ist also möglich, dass dadurch der Untergrund mit Chemoreceptoren geprüft wird. Die Vermutung Hughes' (1950), dass das feine Köpfchen am Ende des Bohrstachels der Chelicere (Abb. 8 b) ein Sinnesorgan sein könnte, erscheint daher als durchaus gegeben, ist aber sonst durch nichts belegt (vgl. S. 84).

Die bei den meisten Tyroglyphiden vorhandenen Genitalnäpfe, welche als Chemorezeptoren (S. 25) ebenfalls der Prüfung des Untergrundes dienen, fehlen bei den *Anoetinae;* nur die Deutonymphe weist zwei Paar als Rudimente auf (S. 103; 123).

7. Das Verdauungssystem.

a) *Der Darmkanal.*

Das Darmsystem stimmt sowohl in der Anatomie wie in der Histologie mit dem überein, was verschiedene Autoren (T. E. Hughes und A. M. Hughes 1938; Haller 1880;

VOL. 35 1954

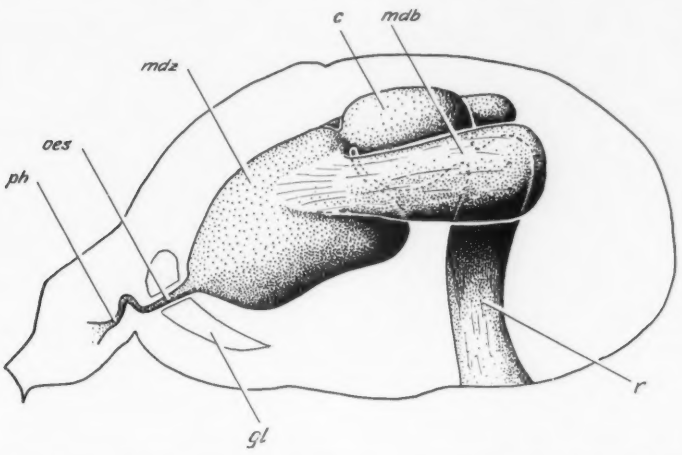


Abb. 13. Darmkanal in Seitenansicht. *ph* Pharynx, *oes* Oesophagus, *mdz* zentraler Mitteldarmabschnitt, *mdb* Mitteldarmblindsack, *c* Colon, *r* Rectum; *gl* Schlundganglion.

MICHAEL 1901; VITZTHUM 1940/43 u.a.) bei Vertretern der *Acaridiae* und anderer Milbengruppen (HENKING 1882; REUTER 1909) gefunden haben. Aus diesem Grunde und weil besonders die Histologie nicht mit den für ihr Studium notwendigen Spezialfärbungen untersucht wurde, soll auch hier auf eine ausführliche Schilderung der Verhältnisse verzichtet werden.

Der durchgehende Darmkanal gliedert sich in Pharynx, Oesophagus, Mitteldarm, Colon und Rectum (Abb. 13). Ich halte mich dabei an die Nomenklatur, wie sie MICHAEL in seinen Publikationen verwendet.

Beim Pharynx liegen in der Ruhelage dorsale und ventrale Wand dicht aufeinander. Während die ventrale Wand mit den chitinösen Verspannungen des Mundes in Beziehung steht, ist die dorsale Wand häutig und elastisch. An ihr setzen kräftige Dilatatoren an, die durch Kontraktion eine Ausweitung des Pharynxlumens bewirken und so eine Saugwirkung ausüben (Abb. 14). Die Kontraktion des Pharynx erfolgt zum Teil durch besondere Konstriktoren, welche peristaltische Bewegungen auszuführen vermögen, zum Teil durch die eigene Elastizität. Der Übergang zum Oesophagus wird durch einen deutlichen, mehr oder weniger dorsoventralen Knick des Darmrohres gebildet (Abb. 14a). Dieser ist am lebenden Tier sehr gut zu sehen, besonders weil die caudal gelegenen Bündel der Pharynxdilatatoren auch auf ihn übergreifen und durch die Saugbewegungen eine Streckung der erwähnten Darmbiegung herbeiführen. Der Oesophagus selbst ist sehr dünn und durchbohrt in geradem Verlauf die zentrale Ganglienmasse.

Der anschliessende, recht voluminöse Mitteldarm gliedert sich in einen zentralen, ei- bis kugelförmigen Teil und die paarigen,

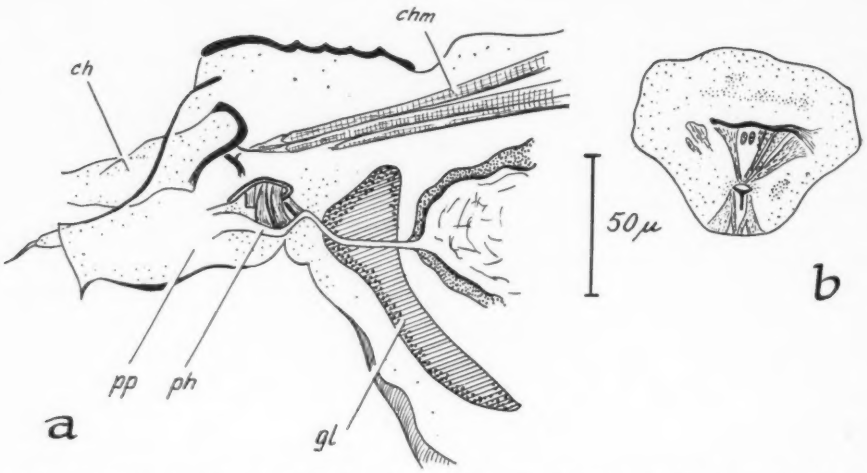


Abb. 14. Schlundregion. a) Sagittalschnitt, b) Transversalschnitt. *ch* Chelicere, *chm* Cheliceremuskulatur, *gl* Ganglion, *ph* Pharynx mit Pharynxmuskulatur, *pp* Palparium.

caudalwärts bis über das Rectum hinaus reichenden Mitteldarmblindsäcke. Bei hochträchtigen Weibchen, die bis acht Embryonen im Ovidukt aufweisen können, kommt es zu starken Verlagerungen der übrigen Eingeweide, besonders der Mitteldarmblindsäcke. Diese werden dann aus ihrer ursprünglichen craniocaudalen Richtung im hintern Teil in eine ventrodorsale abgedrängt, so dass sie bei oberflächlicher Betrachtung stark verkürzt erscheinen.

Nach den übereinstimmenden Angaben in der Literatur besteht der Mitteldarm aus einem Platten- oder Pflasterepithel, das einer feinen Basalmembran aufliegt. Wie Schnitte zeigen, wachsen im caudalen Abschnitt des zentralen Mitteldarmes, vor allem aber in den hinteren Teilen der Blindsäcke (Abb. 16; 24) die Zellen des Epithels gegen das Lumen keulenförmig vor, werden vakuolisiert und erhalten so ein drüsenzellartiges Aussehen. Bei der Lebendbeobachtung erscheinen die Zellen prall und abgerundet und zeigen nicht die ausgeprägte Keulenform. Diese dürfte daher zu einem grossen Teil ein Produkt der Fixationsschrumpfungen sein (Abb. 17). In den Blindsäcken lösen sich einzelne Keulenzellen los, die wenig Plasma und sehr viel Granula enthalten, worauf sie im Lumen frei flotieren und sich schliesslich im zentralen Mitteldarmabschnitt mit dem dort befindlichen Nahrungsballen vereinigen. Die Bildung der Keulenzellen verläuft analog zu derjenigen bei den *Trombidiformes* und ist für diese von S. Thor (1903) ausführlich beschrieben worden. Nach anderen Beobachtungen (T. E. Hughes und A. M. Hughes 1938) entleeren die vesiculär gewordenen Zellen eine klare Flüssigkeit ins Lumen.

Die aufgenommene Nahrung gelangt aus dem Oesophagus in den zentralen Mitteldarmabschnitt, verbleibt dort und dringt normalerweise nicht in die Blind-

VOL. 35 1954

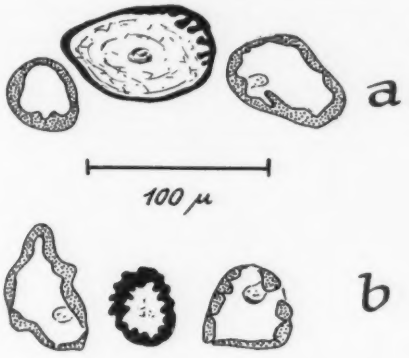


Abb. 15. Querschnitte durch Colon und Mitteldarmblindsäcke. a) Colon gefüllt, einzelne Zellen mit Fortsätzen, b) Colon leer, Wand in Falten gelegt.

säcke ein. Nur ausnahmweise können vereinzelte Hefezellen u.ä. im caudalen, deutlich drüsigen Teil der Blindsäcke beobachtet werden. Durch die Peristaltik der Blindsäcke werden sie über kurz oder lang wieder zurück befördert. Auch der zentrale Teil des Mitteldarmes und das Colon führen starke peristaltische Bewegungen aus. Wie bei den anderen *Acaridiae* konnte auch bei *H. laboratorium* nichts festgestellt werden, das als Muskelfasern angesprochen werden könnte. Die beiden Blindsäcke kontrahieren sich vielfach synchron, häufig aber auch alternierend. Bei der Kontraktion wird die Flüssigkeit aus dem Lumen der Säcke in den zentralen Abschnitt gepresst, die keulenförmigen Zellen berühren sich und füllen das Lumen völlig aus (Abb. 17 d). Bei der Dilatation weichen die Zellen wieder auseinander und es entsteht sowohl in der Flächenansicht wie im optischen Schnitt ein Bild, wie wenn die Zellen völlig voneinander isoliert wären und nur durch die Basalmembran zusammengehalten würden (Abb. 17 c). Auch auf den Schnittpräparaten kann oft eine entsprechende Aufteilung der Blindsackwand festgestellt werden, die kaum auf eine mechanische Schädigung beim Schneiden zurückgeführt werden kann, da dicht daneben liegende Teile desselben Schnittes intakt sind (Abb. 24). In diesen Schnitten ist allerdings die feine Basalmembran auch nicht zu sehen.

Das Colon ist ein kugelförmiger, in seiner Grösse variabler Darmabschnitt. In entleertem Zustande wird die dorsale Wandung in Falten gelegt, sodass bei der Füllung eine starke Grössenzunahme möglich wird (Abb. 15). Die Zellen zeigen dann auch häufig Fortsätze, die ins Lumen hinein ragen und nicht vakuolisiert sind. Schliesslich wird ein kugelförmiger Kotballen gebildet, der durch ein von den Epithelzellen abgesondertes Sekret mit einer dünnen Hülle umgeben werden soll (Vitzthum 1940/43). Tatsächlich kann auch bei *H. laboratorium* eine konzentrische Schichtung des scharf konturierten Kotballens gesehen werden.

Das anschliessende Rectum verläuft in dorsoventraler Richtung zum Anus und ist wie bei den übrigen *Acaridiae* mit Längsmuskelfasern versehen.

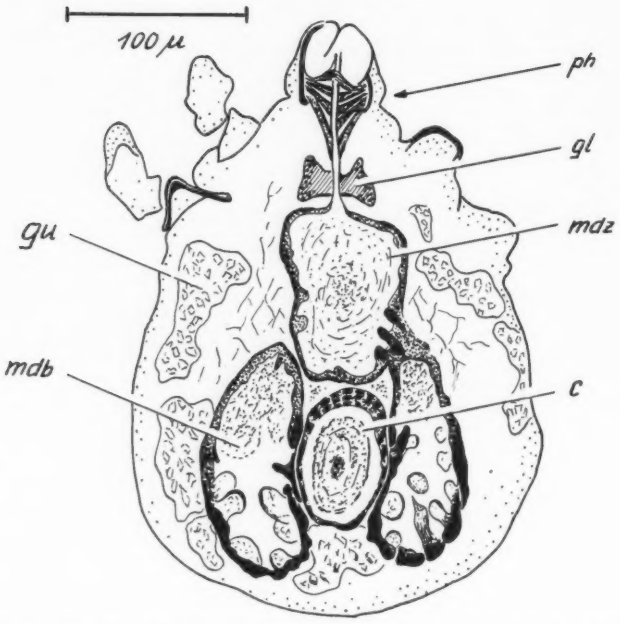


Abb. 16. Schiefer Horizontalschnitt durch ein Weibchen. Die Blindsäcke sind nur im cranialen Teil mit Nahrungsbrei gefüllt; dieser ist durch die Schrumpfungen während der Fixation aus dem zentralen Mitteldarmabschnitt in die Blindsäcke gepresst worden. *c* Colon, *gl* Ganglienmasse, *gu* Guanin der Speicherniere, *mdb* Mitteldarmblindsäcke, *mdz* zentraler Abschnitt des Mitteldarmes, *ph* Pharynx mit Muskulatur.

VOL. 35 1954

Die sagittal gerichtete Afterspalte wird durch kurze, transversale Muskeln, die von ihrem Rande zur benachbarten Körpercuticula ziehen, geöffnet (Abb. 23 b).

Über die Funktion der Mitteldarmblindsäcke gehen die Meinungen auseinander. Dienen sie der Aufspeicherung der Nahrung, vollziehen sie die Resorption oder liefern sie Verdauungsfermente? Die heutige Auffassung, die durch meine Befunde an *H. laboratorium* gestützt wird, geht dahin, dass die Blindsäcke hauptsächlich Fermente produzieren, daneben aber auch noch Exkrete ins Lumen abgeben.

Bei der lebenden Milbe werden die Blindsäcke nicht mit Nahrungsbrei gefüllt (Abb. 17 a). Gegenteilige Befunde an Schnittpräparaten, z.B. Füllung der cranialen Hälfte (Abb. 16) beruhen auf einem passiven Eindringen des Nahrungsbreies aus dem zentralen Mitteldarm in die Blindsäcke, was durch den Schrumpfungsdruck bedingt ist. Ob Exkrete in nichtkristallisierter Form, wie das NALEPA (1884/85) annimmt, abgegeben werden, wurde nicht beobachtet, wäre aber in beschränktem Ausmasse denkbar, da kein nach aussen offenes Exkretionssystem vorhanden ist (S. 96). Als Hauptresorptions-

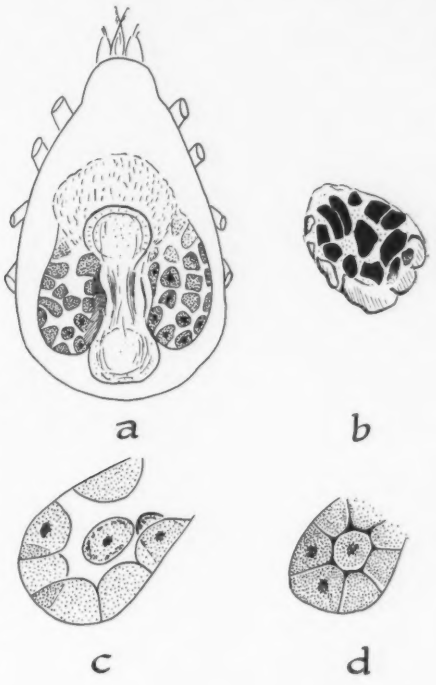


Abb. 17. Mitteldarmblindsäcke. a) Vitalfärbung des Darmes; die Zellen der Blindsäcke sind stark angefärbt, b) Einzelne Blindsackzelle eines mit Toluidinblau vitalgefärbten Individuums. Im Innern schollenförmige, gefärbte Körper, aussen ungefärbte, helle Körper, die im Aussehen den Guaninkristallen der Speicherniere entsprechen. c) Blindsack in gedehntem und in kontrahiertem (d) Zustand (Lebendbeobachtung). Die Zellen sind prall. Die Keulenform auf Schnittpräparaten dürfte daher zur Hauptsache ein Fixationsprodukt sein.

stelle dürfte das Colon funktionieren. In vielen Fällen konnten in diesem Darmabschnitt noch gut erhaltene Hefezellen festgestellt werden. Auch T. E. Hughes u. A. M. Hughes (1938) fanden im Colon von *Glycyphagus domesticus* noch intakte Pilzhyphen. Ausserdem verbleibt der Nahrungsballen einige Zeit im Colon und schrumpft dabei merklich zusammen (Grössenänderung des Colons, Abb. 15), was auf eine Resorption hindeutet.

Beim Verfüttern von verschiedenen Vitalfarbstoffen färben sich die Zellen der Blindsäcke sehr intensiv, während der Mitteldarm und das Colon mehr durch die darin enthaltenen, schwach gefärbten Nahrungsballen deutlicher erkennbar werden. Ich glaube nicht, dass der Farbstoff durch Resorption direkt aus dem Darmlumen in die Blindsackzellen gelangt, sondern dass er aus der Körperflüssigkeit durch die Zellen „aufgesogen" wird (S. 96), zumal die Blindsäcke zwischen den gefärbten Zellen völlig farblos und hyalin erscheinen.

b) *Der Fettkörper.*

Die weissliche Farbe von *H. laboratorium* kommt, wie bereits angeführt wurde, durch die Beugung des Lichtes an den Guaninkristallen der Speicherniere (s.u.) und an den Tröpfchen des Fettkörpers zustande. Dieser setzt sich aus vielen kleinen, kugeligen Tröpfchen zusammen und ist in der Hauptsache in

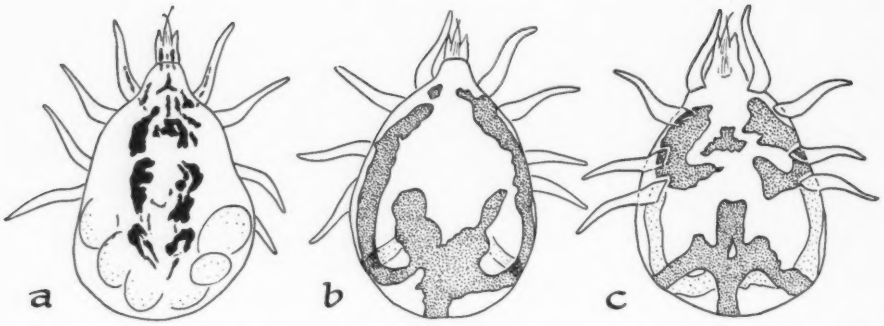


Abb. 18. Anordnung des Fettkörpers (a) und der Speicherniere in Dorsalansicht (b) und Ventralansicht (c).

zwei paramedianen Längsstreifen angeordnet (Abb. 18 a). Ausserdem sind solche Fettröpfchen, die sich mit Sudan III schön rot färben lassen, auch in den Muskeln und an der Sehnenplatte (Endosternit) zu finden. Es handelt sich dabei nicht um ein besonderes, wohl abgegrenztes Organ, sondern einfach um Teile des lockeren, parenchymatischen Gewebes, in welches das Fett eingelagert wird. Die Ausdehnung des Fettkörpers kann daher je nach dem gebotenen Futter beträchtlich variieren.

VOL. 35 1954

8. Das Exkretionssystem.

Die *Anoetinae* besitzen kein besonderes Exkretionsorgan. Trotzdem werden Konkretionen aus Guanin, dem Exkretionsprodukt aller Milben gebildet. Das Guanin soll in diesem Falle von den Zellen des Mitteldarmes produziert werden und regellos im Körperparenchym abgelagert werden, sodass von einer Speicherniere gesprochen werden kann (Vitzthum 1940/43). Als Produktionsort könnten die Blindsackzellen in Frage kommen. Bei Vitalfärbungen durch Verfüttern von Trypanblau konnten in mehreren Fällen in den erwähnten Zellen gut abgegrenzte Körper festgestellt werden (Abb. 17 b), wobei die zentral gelegenen kräftig blau gefärbt waren, die peripheren dagegen in ihrem Aussehen durchaus den Guaninkristallen der Speicherniere entsprachen. Die regellose Ablagerung im Körper trifft nach unseren Feststellungen bei *H. laboratorium* nicht ganz zu. Wohl bildet das abgelagerte Guanin ein kompliziertes, in seinen feineren Umrissen variables Muster, doch stimmt dieses Muster in den Grundzügen bei allen Individuen überein (Abb. 18 b, c). Mikroskopische Beobachtungen am lebenden Tier haben ergeben, dass die Guaninstränge und -komplexe von einer zarten Membran umfasst sind, was besonders bei Bewegungen der Eingeweide deutlich wird.

Abb. 18 zeigt, dass die Speicherniere mehr oder weniger eng den einzelnen

Darmabschnitten angelagert ist. Das braucht weiter nicht überraschend zu sein, da man annehmen kann, dass die von ihr eingenommenen Stellen die einzigen neben dem Darmkanal und den Geschlechtsorganen freien Räume sind. Da nun aber bei den *Prostigmata* (Untergruppe der *Trombidiformes*) die Basalmembran des Darmes oft zugleich auch diejenige der Exkretionsschläuche ist, also eine enge Verbindung zwischen Darm und Exkretionsorgan besteht, wäre es denkbar, dass auch bei *H. laboratorium* an einigen Stellen ein ähnlich inniger Kontakt bestünde. Das von den Darmzellen ausgeschiedene Guanin könnte dann auf kürzestem Weg an seinen Bestimmungsort gelangen. In jedem Schnittpräparat können tatsächlich Kontaktstellen zwischen Darm und Speicherniere gefunden werden. Wohl handelt es sich bei den *Prostigmata* um Vertreter aus einer ganz anderen Unterordnung, welche über zellulär aufgebaute, nach aussen sich öffnende Exkretionskanäle verfügt, doch ist die Annahme berechtigt, dass die Verhältnisse der *Anoetinae* nur eine Spezialisation repräsentieren, dass die ursprünglich vorhandenen Exkretionsschläuche die Funktion der Guaninbildung an die Darmzellen abgetreten und als Folge davon ihren zellulären Bau eingebüsst, ihre Lage aber beibehalten haben. Embryologische Untersuchungen über die Anlage der Organe könnten vermutlich zur Klärung beitragen.

Nach allem, was über Darm- und Exkretionssystem gesagt wurde, könnte sich der Stoffwechsel folgendermassen abspielen: Die hauptsächlich durch die Zellen des Colons und vielleicht auch diejenigen des zentralen Mitteldarmabschnittes resorbierten Stoffe gelangen in die Körperflüssigkeit. Die verwertbaren Anteile werden als Betriebsstoffe direkt den Organen, als Speicherstoffe dem Fettkörper zugeführt. Die unverwertbaren Anteile, z.B. Farbstoffe, und die Abbaustoffe der Zellen des Darmes selbst und der übrigen Organe werden ebenfalls in die Körperflüssigkeit abgegeben und von den Blindsackzellen aufgenommen. Von dort werden diese Stoffe teils ins Darmlumen ausgeschieden, von wo sie mit der Faeces ins Freie gelangen, teils in Guanin verwandelt und in die anliegende Speicherniere abgegeben. Diese Vermutung müsste allerdings einer histochemischen Prüfung unterzogen werden.

9. Die Öldrüsen.

Auf der Dorsalseite findet sich auf der Grenze Metapodosoma/Opisthosoma ein Paar sogenannter Öldrüsen (Abb. 3b; 19). Sie bestehen aus einem im voll ausgebildeten Zustande umfangreichen Sack, der unmittelbar unter dem Integument liegt. Ein kurzer, chitinisierter Kanal führt zum feinen Drüsenporus. Bei jeder Häutung werden die Drüsen ebenfalls abgeworfen. An frisch gehäuteten Individuen sind sie nicht zu finden, werden aber bald durch Eindellung des Integumentes neu gebildet. Aus diesem Grunde müssen wir sie als Hautdrüsen bezeichnen. Mit der Zeit bildet sich in diesen Drüsen eine

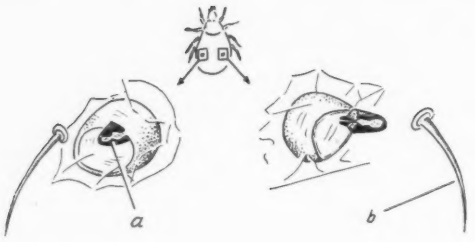


Abb. 19. Oeldrüsen. Der kurze Ausführungsgang (*a*) ist deutlich zu sehen. *b* Borste.

gelblich-grüne, ölige Flüssigkeit. Durch den Ausführungsgang tritt das Sekret nach aussen und überzieht die ganze Körperoberfläche. Die Wandung der entleerten Drüse legt sich in Falten. Durch Druckeinwirkung kann im Deckglaspräparat unter Umständen das Herausquellen des Öles in Form eines Tropfens erzwungen und direkt beobachtet werden.

In der älteren Literatur (z.B. HALLER 1880, CLAPARÈDE 1886) wurden diese Drüsen meist als Exkretionsorgan interpretiert. Aber schon MÉGNIN (1874) glaubt nicht mehr an diese Funktion, sondern nimmt an, dass sie eine ähnliche Rolle wie die Krebssteinchen spielen könnten. Heute ist die Deutung als Öldrüse durchgehend anerkannt.

VOL. 35 1954

10. Kreislauf- und Atmungssystem.

Besondere Organe für den Gasaustausch und die Stoffverteilung fehlen bei *H. laboratorium*. Die Körperflüssigkeit, welche Leukozyten enthält, wird durch die Kontraktion der Körpermuskulatur und durch die zeitweisen, rhytmischen Bewegungen der Darmblindsäcke durch die Maschen des Körperparenchyms getrieben und gemischt. Die äussere Atmung vollzieht sich lediglich durch das dünne Integument.

11. Das Genitalsystem.

a) *Der weibliche Genitalapparat.*

Der weibliche Geschlechtsapparat weist als Besonderheit zwei Geschlechtsöffnungen auf, von denen die eine nur der Spermienaufnahme, die andere nur der Eiablage dient. Wie Abb. 20 zeigt, setzt sich das weibliche Genitalsystem aus der Kopulationsöffnung (Bursa copulatrix), einem engen Verbindungsgang, dem unpaaren Receptaculum seminis, den anschliessenden, paarigen Ovarien, den beiden Ovidukten, der geräumigen „Vagina" und der vorderen Genitalöffnung, „Vulva" zusammen. Die Bezeichnungen „Vagina" und „Vulva" sind im Falle der *Acaridiae* irreführend, da diese Abschnitte die entsprechenden Funktionen nicht ausüben. Bei anderen Milbengruppen aber funktionieren die homologen Abschnitte tatsächlich als Vagina und Vulva. Die Homologie ist daher

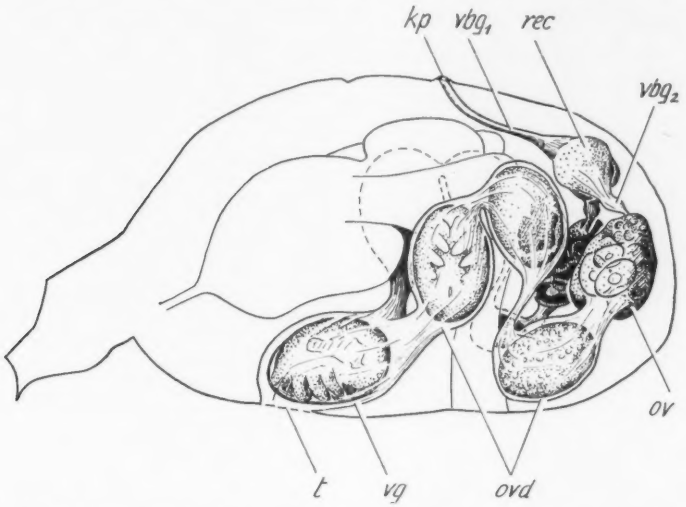


Abb. 20. Weiblicher Geschlechtsapparat in Seitenansicht. Der Darmkanal ist in den Umrissen eingezeichnet. *kp* Kopulationsporus, *vbg*$_1$ Verbindungsgang zum Receptaculum, *rec* Receptaculum seminis, *vbg*$_2$ Verbindungsgang zum Ovar, *ov* Ovar, *ovd* Ovidukt, *vg* „Vagina", *t* Tokostom.

L. 5 54

das einzige Argument, welches die Anwendung der gleichen Nomenklatur auch bei den Acaridiae rechtfertigt. Um einen Irrtum auszuschlissen ist es aber besser, die vordere Geschlechtsöffnung ihrer Funktion entsprechend als Tokostom (Eilegeöffnung) zu bezeichnen.

Die Kopulationsöffnung liegt dorsal auf der Medianlinie des Opisthosomas, ziemlich genau auf der gleichen Höhe wie die beiden Öldrüsen. Es handelt sich um einen ausserordentlich feinen Porus, der von einer kleinen, ringförmigen Vorwölbung der Cuticula umgeben ist (Abb. 21). Von irgend einer Erweiterung des Verbindungsganges konnte nichts gesehen werden, so dass die Bezeichnung „Bursa" für den unmittelbar unter dem Porus gelegenen Teil des Ganges nicht den Gegebenheiten entspricht.

Noch schwieriger als der Kopulationsporus ist der Verbindungsgang zum Receptaculum seminis zu finden. In den meisten Fällen wird ein Erkennen des engen, häutigen Ganges durch das Guanin der Speicherniere unmöglich gemacht.

Das Receptaculum seminis liegt gegen den caudalen Pol des Weibchens, zwischen den Enden der Mitteldarmblindsäcke, also noch im dorsalen Teil des Opisthosomas. Seine Grösse schwankt beträchtlich, je nach dem Füllungsgrad mit Spermamasse (Abb. 23; 24a). In einer diffus gefärbten Grundmasse liegen die nur 2,5—5 μ grossen, kugeligen Spermien.

Abb. 21. Kopulationsporus in Seitenansicht. Starke Vergrösserung.

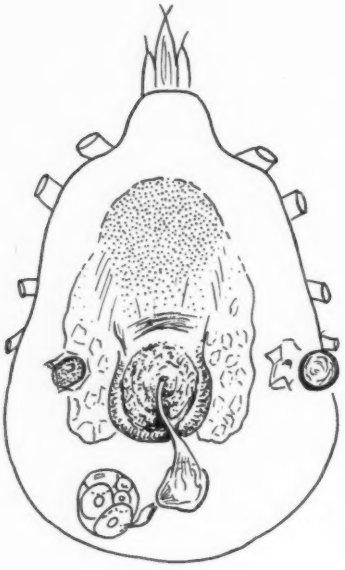


Abb. 22. Kopulationsporus, Receptaculum seminis, Ovar und Verbindungsgänge. Lebendbeobachtung an einem sehr guaninarmen Individuum. Das rechte Ovar ist von der Speicherniere (nicht eingezeichnet) verdeckt. Bei der rechten Öldrüse ist das Sekret als Tropfen ausgetreten. Der ungefärbte Darm ist gut erkennbar. Zentraler Mitteldarmabschnitt und Colon sind durch den Inhalt dunkel getrübt, während die Blindsäcke hell und völlig klar erscheinen, d.h. keinen Nahrungsbrei enthalten.

Die paarigen Verbindungsgänge zu den Ovarien sind zarte, häutige Schläuche, die nach links und nach rechts in die Tiefe führen und eine Anschwellung aufweisen (Abb. 22).

Die Eierstöcke liegen am weitesten caudal und sind am lebenden Tier im durchfallenden Licht gut zu erkennen, da jener Bereich in der Regel frei von Guanin ist (Abb. 3; 18). Der dorsocaudale, d.h. dem Receptaculum zugewendete Teil erscheint als kompakte, einheitliche Masse. Erst im cranioventralen Abschnitt, also gegen den Eileiter zu, lassen sich einzelne Eier von verschiedener Grösse unterscheiden.

Die Wandung des Oviduktes ist sehr dünn, äusserst elastisch und widerstandsfähig. Er nimmt einen S-förmigen Verlauf, der je nach dem Gehalt an Eiern etwas variiert (Abb. 20). So kann z.B. der dorsalste Teil nicht nur neben sondern sogar über die Mitteldarmblindsäcke zu liegen kommen. Die in den Eileiter gelangenden Eier dehnen diesen sehr stark aus. Infolge seiner Elastizität zieht sich der Ovidukt hinter jedem Ei wieder zusammen. In der Regel sind zugleich mehrere Eier im Eileiter, so dass dieser ein rosenkranzähnliches Aussehen erhält. Die beiden Eileiter vereinigen sich unter dem Mitteldarm zur „Vagina", die, auch wenn sie keine Eier enthält, sehr geräumig ist.

VOL. 35 1954

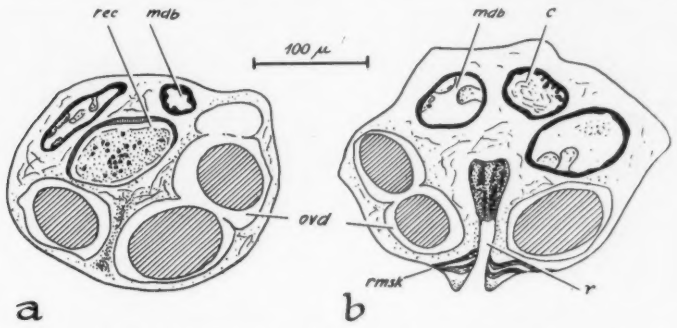


Abb. 23. Transversalschnitte durch ein Weibchen. a) auf Höhe des Receptaculum, b) auf Höhe des Afters. *c* Colon, *mdb* Mitteldarmblindsäcke, *ovd* Oviduk, *r* Rectum, *rec* Receptaculum seminis, *rmsk* Muskeln des Rectums.

Das quergestellte Tokostom liegt auf der Ventralseite zwischen den Epimeren des zweiten Beinpaares (Abb. 3 a). Die Eilegeöffnung ist dehnbar und weist ausser dem leicht verdickten Vorderrand keine weitere Verstärkung auf.

Die Eier, welche in den Eileiter gelangen, stehen mitten in der Furchung oder haben das Blastodermstadium bereits erreicht, da die Befruchtung bereits im Ovar erfolgt ist. Es fehlt ihnen noch die starre Eihülle. Daher kommt es infolge der peristaltischen Bewegungen des Eileiters zu starken Verformungen und Einschnürungen, so dass sie bei oberflächlicher Betrachtung leicht mit den Darmblindsäcken verwechselt werden können. Da bei den Eiern während ihrer Wanderung durch den Eileiter eine leichte Grössenzunahme beobachtet werden kann, nehmen T. E. Hughes u. A. M. Hughes (1938) an, dass der caudale Abschnitt des Oviduktes zur Dotterbildung befähigt sei. Der craniale Teil sezerniert die Schale der Eier. Diese haben sich unterdessen weiterentwickelt, so dass bei der Eiablage innerhalb der Eischale ein schon weit entwickelter Embryo, oft sogar schon die fertig ausgebildete Larve vorliegt (Abb. 28 b, c).

b) *Der männliche Genitalapparat.*

Die Hoden sind paarig und am caudalen Ende des Opisthosomas gelegen. Die beiden dünnen Vasa deferentia ziehen nach vorn und vereinigen sich zu einem kurzen Ductus ejaculatorius, welcher unmittelbar vor dem Anus, ungefähr auf Höhe des vierten Beinpaares mündet. Die Geschlechtsöffnung ist mit einem Penisapparat versehen, der nach unseren Beobachtungen aus einer oberflächlich gelegenen, nach cranial sich öffnenden Chitinspange und dem offenbar an der caudalen Wand des Ductus ejaculatorius entspringenden Penis besteht (Abb. 4; 25). Dieser ist sehr klein, mehr oder weniger nach caudal gerichtet und soll bei den *Acaridiae* nicht als Rohr, son-

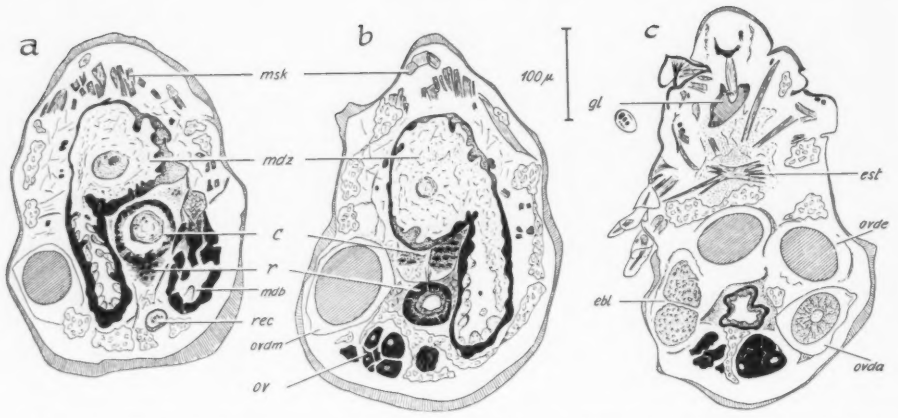


Abb. 24. Horizontalschnitte durch ein Weibchen. a) in Höhe des Colon, b) unter dem Colon, c) unter dem Mitteldarm. *c* Colon, *ebl* Ei im Blastodermstadium, *est* Endosternit, *gl* Ganglion, *msk* Muskeln, *mdz* zentraler Mitteldarmabschnitt, *mdb* Mitteldarmblindsäcke, *ov* Ovar, *ovda* Anfangsteil des Oviduktes, *ovdm* Mittelstück, *ovde* Endabschnitt, *r* Rectum, *rec* Receptaculum seminis.

dern als Rinne ausgebildet sein. Auf Abb. 26 b kann wenigstens der proximale Teil als Rinne interpretiert werden.

In den Ductus ejaculatorius münden zwei accessorische Drüsen von beträchtlicher Grösse. Sie liegen zur Hauptsache vor den Gonaden und über dem Genitalporus und dehnen sich auch cranialwärts im Podosoma aus (Abb. 25). Die linke Drüse reicht am weitesten dorsal, ist gekammert, ohne aber ein deutliches Lumen aufzuweisen und dürfte der „gekammerten Drüse" anderer *Acaridiae* entsprechen. Die rechts in den Ductus ejaculatorius einmündende Drüse liegt mehr ventral und stösst in cranialer Richtung vor, wobei sie sich zugleich in die Medianebene verlagert und sogar stark auf die Gegenseite hinüber greifen kann. Sie zeigt ein weites, gekammertes Lumen. Über die Funktionen dieser zwei Drüsen ist nichts Bestimmtes bekannt. Man nimmt an, dass die grössere, „gekammerte Drüse" ein flüssiges Sekret für das Ejakulat liefert. Die kleinere Drüse soll nach verschiedenen Autoren (s. Vitzthum 1940/43) ein feinkörniges Sekret produzieren, nach T. E. Hughes u. A. M. Hughes (1938) als Vesicula seminalis funktionieren. Unsere Befunde sprechen eher für die erste Deutung. Wenn es sich um eine Vesicula seminalis handeln würde, müssten zum mindesten in einigen Fällen Spermien in ihrem Lumen zu finden sein. Das konnte aber in unseren Präparaten, selbst in Fällen, wo Spermien in den Vasa deferentia auftraten, nicht beobachtet werden. Dagegen ist das Lumen von einem leicht getönten, homogenen Medium erfüllt, ohne dass aber einzelne Granula unterschieden werden können.

Wie Abb. 26 b, c zeigt, wird der Genitalporus von Chitinstrukturen flankiert, die im Schnittbild deutlich als Falten erscheinen (Abb. 25 c). Auffallend

VOL. 35 1954

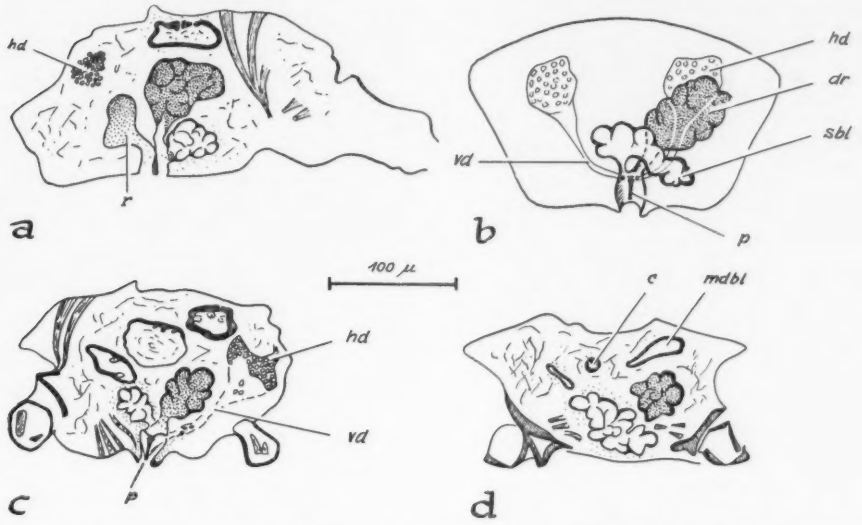


Abb. 25. Männlicher Geschlechtsapparat. a) Schiefer Sagittalschnitt, b) Ansicht von cranial, Schema, c) Transversalschnitt durch den Genitalporus, d) Transversalschnitt vor dem Genitalporus. *c* Colon, *dr* gekammerte Drüse, *hd* Hoden, *mdb* Mitteldarmblindsack, *p* Penis, *r* Rectum, *sbl* „Samenblase", *vd* Vas deferens.

sind in der Flächenansicht die vier dunkleren Punkte, welche bei starker Vergrösserung in der Schrägansicht als schwache Vorwölbungen erscheinen. Es könnte sich dabei um rudimentäre Genitalnäpfe handeln, obschon in der Literatur angegeben wird, dass die *Anoetinae* im adulten Zustand keine solchen aufweisen. Es sind das napfähnliche Gebilde, welche bei den *Sarcoptiformes* mit zwei Paaren die Genitalöffnung sowohl des Männchens als auch des Weibchens flankieren. Wegen ihres äusserlichen Aussehens wurden sie ursprünglich als Saugnäpfe bezeichnet. MÉGNIN (1874) glaubte demgegenüber, dass diese Organe bei der Ablage der Eier mitwirkten. H. SCHULZE (cit.n. VITZTHUM 1940/43) konnte dann nachweisen, dass es sich wie bei den entsprechenden Gebilden der Hydrachnellen um Chemorezeptoren handelt und dass sie eine entsprechend starke Nervenversorgung aufweisen. Mit ihnen prüft das Weibchen vor der Eiablage den Untergrund auf seine diesbezügliche Eignung. Zu diesem Zwecke können sie in den meisten Fällen etwas vorgestülpt werden, weshalb sie oft auch als Genitaltaster bezeichnet werden. Die Genitalnäpfe der Männchen sind sicher ebenfalls keine Saugeinrichtungen, obwohl gerade hier eine Haftfunktion während der Copula zweckmässig erscheinen würde. Über ihre Funktion beim Männchen lässt sich nichts Sicheres sagen. Wahrscheinlich spielen sie als Sinnesorgan beim Auffinden des Kopulationsporus eine Rolle. Ob diese chemorezeptorischer oder taktiler Natur ist, lässt sich nicht entscheiden.

Bei *H. laboratorium* fehlen solche Genitalnäpfe im weiblichen Geschlecht

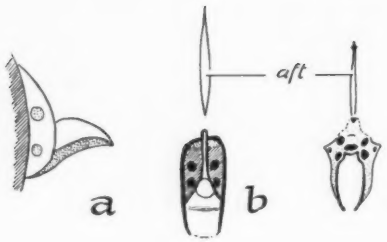


Abb. 26. Äussere männliche Genitalorgane. a) Penis von *Tyroglyphus mycophagus* (nach MÉGNIN 1874), Seitenansicht, b—c) *H. laboratorium*, Flächenansicht. In b) Penis ausgestreckt. *aft* After.

vollständig. Im männlichen Geschlecht könnten die erwähnten Buckel letzte, funktionsuntüchtige Rudimente darstellen. Leider waren die zur Verfügung stehenden Schnitte nicht geeignet, um eine eventuell vorhandene Nervenversorgung festzustellen. Doch spricht die Ähnlichkeit mit Abbildungen, wie sie z.B. MÉGNIN (1874) für *Tyroglyphus mycophagus* publizierte (Abb. 26 a) für die Wahrscheinlichkeit obiger Deutung (vgl. S. 90; 123).

C. UNTERSCHIEDE DER GESCHLECHTER.

Bei den *Acaridiae* tritt in der Regel Geschlechtsdimorphismus auf, der in einzelnen Familien so ausgeprägt sein kann, dass die beiden Geschlechter völlig heteromorph werden können. Bei *H. laboratorium* bewegen sich die Unterschiede in bescheidenerem Rahmen. Darüber orientiert Tab. 2.

Tab. 2. *Unterschiede der Geschlechter.*

	Weibchen	Männchen
Körpergrösse in μ		
HUGHES: Totallänge	460 (400—510)	380 (330—440)
Breite	310 (260—390)	230 (170—250)
PERRON: Idiosomalänge	— (410—480)	— (270—300)
Breite	— (270—300)	— (200—250)
Körperform	eiförmig	annähernd fünfeckig
Lage der Ventralringe (Abb. 3 a, 4 a)	caudales Paar näher beisammen als craniales Paar	craniales Paar näher beisammen als caudales Paar
Bein IV (Abb. 3, 4)	lang, schlank, an der Lokomotion beteiligt	gedrungen, plump, werden passiv nachgeschleppt
Endkralle (Abb. 6)	zierlich sichelförmig	plump schwach gebogen
Geschlechtsverhältnis	4 : 1	
	Extremwert 20 : 1	

VOL. 35 1954

Diese Tabelle bedarf noch folgender Erläuterungen: Das Bestimmen der Körpergrösse ist problematisch. Wählt man die grösste Länge als Mass, so entstehen dadurch Fehler, da einerseits die feinen, vordersten Spitzen des Gnathosomas oft schwierig zu sehen sind und anderseits die Mundgliedmassen, vor allem die Cheliceren, welche in der Regel am weitesten nach vorn ragen, in ganz verschiedenen Stellungen gehalten werden können. Richtiger ist es also, wenn man nur die Länge des Idiosomas, also ohne Berücksichtigung des 70—100 μ langen Gnathosomas misst. Dabei ist sowohl die vordere Grenzlinie (vorderster Punkt der Epimeren I) als auch die hintere (caudaler Körperpol) ohne weiteres zu finden. Die grosse Variationsbreite der so erhaltenen Werte beruht darauf, dass die Grösse des Idiosomas infolge der Dehnbarkeit der Cuticula mit dem Ernährungszustand und bei den Weibchen mit dem Graviditätsgrad variiert. Es wurden ausgewachsene, hungernde Weibchen mit nur 0,28—0,30 mm Idiosomalänge gemessen. Diese Tiere zeigten zudem eine ähnliche Trübung des Körperinhaltes wie Nymphen im Ruhestadium vor der Häutung (S. 127). Auf Hefemastfutter traten umgekehrt Riesenweibchen auf, die über ½ mm Idiosomalänge aufwiesen. Bei diesen Tieren waren Speicherniere und vor allem der Fettkörper so stark entwickelt, dass von den anderen Organen nichts mehr zu sehen war. Die gleichen Variationen ergeben sich naturgemäss auch für die Breitenmessungen.

Ein Geschlechtsverhältnis von Männchen zu Weibchen von ungefähr 1:4 scheint das normale zu sein. Dieses Verhältnis tritt am häufigsten und vor allem in guten, nicht zu frischen Zuchten auf. Wie weiter unten gezeigt wird, entstehen die Männchen auf parthenogenetischem Wege (S. 112). Es ist daher verständlich, dass je nach den Ausgangsbedingungen einer Zucht ganz verschiedene Verhältniszahlen registriert werden können.

L.
5
54

IV. FORTPFLANZUNG UND ONTOGENESE.

A. ZUCHTMETHODEN.

Die Grundlage sowohl für die deskriptive als auch für die experimentelle Untersuchung der Ontogenese bilden einwandfreie Zuchtmethoden. Aber gerade diese unumgängliche Voraussetzung ist bei *H. laboratorium* sehr schwierig, in manchen Fällen überhaupt kaum zu erfüllen. Das Prüfen der verschiedenen Zucht- und Desinfektionsmöglichkeiten hat denn auch einen grossen Teil der Arbeitszeit benötigt. Ausserdem mussten aus demselben Grunde die meisten Experimente mehrmals wiederholt werden, da die jeweils angesetzten Versuchsbedingungen, soweit sie den Futterboden betrafen, häufig nicht konstant gehalten werden konnten. Es mag daher berechtigt sein, etwas ausführlicher auf die verwendeten Methoden und die dabei erzielten Ergebnisse einzugehen.

1. Stammzuchten.

Das Halten von Dauerzuchten bietet keinerlei Schwierigkeiten, ist es doch eine der hervorstechensten und unangenehmsten Eigenschaften dieser Milbe, einmal besiedelte Drosophilazuchten während längerer Zeit mit immer neuen Generationen zu überschwemmen.

Die Stämme werden in Standardschalen auf dem üblichen *Drosophila*-Standard-Futter (Agar 10 gr., Zucker 100 gr., Mais 200 gr., Wasser 1 ½ L., Hefe) gehalten. Solche Zuchten können während Wochen sich selbst überlassen werden. Am besten entwickeln sich die Milben, wenn auf demselben Futter zugleich *Drosophilae* gehalten werden. Die Larven verhindern durch ihre Wühlarbeit, dass sich auf der Oberfläche ein dicker Hefebelag bildet, in welchem die Milben kleben bleiben und ersticken.

2. Zuchtmedien für die Experimente.

Wesentlich schwieriger gestalten sich die Zuchten, welche für Experimente verwendet werden, da sie nicht nur die Ernährung der Milben sichern müssen, sondern auch zahlreichen anderen Bedingungen genügen sollten.

a) *Einzelzuchten.*

Für die Untersuchung des Lebenszyklus werden die Tiere in Einzelzuchten gehalten. Bei der Wahl des Futterbodens muss berücksichtigt werden, dass sich die Milben vor dem Übergang in den Torpor, das Ruhestadium vor den Häutungen (S. 127), ins Futter einbohren und dass die Exuvien äusserst hinfällig und durchsichtig sind. Der Futterboden muss daher homogen und durchsichtig sein. Es wurde eine Mischung von 3—4 % Agar und 7—20 % Zucker mit einem Überzug von lebender Hefe verwendet. Die heiss filtrierte Agar-Zucker-Masse wird in die Zuchtgefässe gegossen, der erstarrte Futterboden mit einer stark verdünnten Hefeaufschwemmung überdeckt und das überschüssige Hefewasser abgesogen. Der regelmässige, dünne Hefeüberzug verzögert die Verpilzung. Starke Vermehrung der Hefezellen, Pilzbefall, Frassspuren und Austrocknungsrisse verändern das Futter nach zwei bis drei Tagen so stark, dass es nicht mehr den gestellten Bedingungen genügt und ersetzt werden muss.

Die Zuchtgefässe müssen folgende Forderungen erfüllen: 1) möglichst kleine Fläche für die Beobachtung, 2) ausbruchssicherer Verschluss. Aus der langen Reihe der ausprobierten Methoden (verschiedene Zuchtgefässe, chemische Abschreckungsmittel, hängender Tropfen, Kapillaren u.a.m.) hat sich einzig die folgende bewährt: Der Futterboden wird in einen Glas- oder Paraffinring eingegossen, der auf einem Objektträger aufgeklebt ist. In den erstarrten Nährboden wird als eigentliches Zuchtgefäss ein kleiner Ring aus Aluminiumfolie (2—3 mm hoch, 4 mm Durchmesser) gesteckt und mit einem vaselinierten Deckglassplitter gut verschlossen (Abb. 27). Auch der grosse Ring wird mit einem Deckglas zugedeckt. Diese Zuchtgefässe ermöglichen eine einwandfreie Beobachtung der Milben sowohl von oben als auch von unten ohne optische Verzerrungen.

VOL. 35 1954

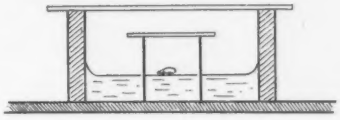


Abb. 27. Schematische Darstellung eines Einzelzucht-Gefässes.

b) *Massenzuchten.*

Für viele Versuche mussten pro Zuchtschale mehrere Hundert Tiere gehalten werden. Als Zuchtgefässe wurden verwendet: Glasringe auf Objektträgern, kleine Glasschalen (ca. 3 cm Durchmesser) und sogenannte Salznäpfchen oder Embryoschalen, welche durch vaselinierte Glasdeckel verschlossen werden. Der Sauerstoffverbrauch der Milben ist so gering, dass die Lufterneuerung bei den täglichen Kontrollen völlig genügt.

Für die Durchführung von Experimenten, die den Einfluss von Aussenfaktoren auf die Entwicklung prüfen sollten, musste der Futterboden folgenden Bedingungen genügen: 1) vollwertiger Nährboden, 2) Konstanz der stofflichen Zusammensetzung, 3) Konstanz des pH-Wertes, 4) Geringe Anfälligkeit für Pilze und Bakterien, 5) Gute Sichtbarkeit der Milben auf dem Futtermedium. Der für die Einzelzuchten verwendete Nährboden entspricht diesen Bedingungen nicht: Die Gärung liefert soviel Säure, dass der Aciditätsgrad trotz Puffer nicht konstant gehalten werden kann. Als Puffer wurde ein Citronensäure-Phosphat-Puffer (nach McIlvain) verwendet, der dem erkaltenden Agargemisch beigegeben wurde, sowie ein HCl—KCl-Puffer nach Clark und Lubs und ein aus Oxalsäure, Borsäure, Borax und Soda zusammengesetztes Puffergemisch nach Thiel, Schulz und Coch (sämtliche cit. n. Lehmann 1942).

Wegen ihrer stark vorgewölbten Ventralseite vermag sich *H. laboratorium* auf trockener, harter Unterlage nicht zu bewegen. Als Zuchtmedien kommen daher nur solche mit relativ weicher Oberfläche oder Flüssigkeiten in Betracht.

a) *Agarböden.*

Der Agar dient lediglich als Träger- und Bindesubstanz. Als Nährsubstrat wurde Bäckerhefe bzw. Trockenhefe oder Hefeextrakt verwendet. Hefeböden mit Zucker oder Mais als Zusatz, sowie Agarböden mit Bouillon als Futter wurden untersucht. Zur Bekämpfung der Pilz- und Bakterieninfektionen wurden die Böden bzw. die Milben mit folgenden Stoffen behandelt: Alkohol, Nipagin, Elkosin, Desogen, Chloramin, Sulfothiazol. Die damit erzielten Ergebnisse waren unbefriedigend. Insgesamt wurden 25 Nährböden in verschiedenen Konzentrationsvariationen auf ihre Eignung geprüft.

Für die praktische Durchführung der Versuche wurde folgender Nährboden verwendet, der sich durch seine einfache Herstellung und seine Homogenität auszeichnet und den oben gestellten Bedingungen am ehesten entspricht: Der Agar erhält lediglich einen Zusatz von 1—5 % aufgekochter Bäckerhefe. Spä-

ter kam anstelle des gewöhnlichen Agars als Bindesubstanz Davis-Agar zur Anwendung. Es hat sich gezeigt, dass die Infektion durch Pilzsporen hauptsächlich durch die eingesetzten Milben erfolgt. Eine Sterilisation der Nährböden ist daher zwecklos, eine Desinfektion der Tiere aber nur beschränkt möglich. Durch folgende einfache Methode kann die Pilz- und Bakterieninfektion auf ein Mindestmass reduziert werden: Die für die Experimente aus den Stammzuchten ausgewählten Tiere werden vorerst durch mehrmaliges Waschen von den gröbsten anhaftenden Futterpartikeln befreit und dann während mehreren Tagen in „Quarantaine"-Zuchten gehalten. Es besteht während dieser Zeit die Möglichkeit, dass wenigstens ein Teil der an den Gelenken haftenden Mikroorganismen abgestreift wird. Durch diese Behandlung werden die störenden Fäulnisprozesse des Futters verzögert, meist aber nicht in genügendem Masse. In diesem Fall wird ein Umsetzen auf frische Böden notwendig.

Für besondere Zwecke (Beschleunigung der Ontogenese, Weiterentwicklung der Deutonymphe, S. 144) wurde die Hefekonzentration auf 25—50 % erhöht („*Mastfutter*"). Die Vor- und Nachteile der übrigen Zuchtmedien sollen hier nicht erörtert werden.

β) Flüssigkeitszuchten.

Gestützt auf die Beobachtung, dass *H. laboratorium* ohne weiteres unter Wasser leben kann, wurden Zuchtversuche in flüssigen Medien unternommen, die aber alle unbefriedigend verliefen. Als Zuchtgefässe wurden Salznäpfchen verwendet.

Der glatte Glasboden der Gefässe bietet den Milben den für die Eiablage und den Häutungsvorgang notwendigen Halt nicht. Beigabe einzelner Baumwollfäden ist völlig ungenügend, Überzug des Bodens mit Papier unbefriedigend, da weisses Papier (Filtrierpapier) schlechte Sichtverhältnisse schafft, gefärbtes Papier für die Milben meist giftig wirkt und sich die Tiere häufig unter das Papier arbeiten.

Als Zuchtmedien kamen folgende Flüssigkeiten zur Anwendung: Wasser, verdünnte Pufferlösung, Zuckerwasser, Zuckerwasser mit lebender Hefe bzw. Trockenhefe, Pufferlösung mit Hefewasser. Wegen Entwicklungsstörungen, Vergiftung durch CO_2, Fäulnis und Verpilzung verliefen diese Versuche negativ.

Es wurden auch Kombinationen von Agarboden mit flüssigem Medium versucht, wobei die Unterlage, bestehend aus Drosophilafutter oder Agar und Trockenhefe, von Wasser bzw. verdünnter Elkosinlösung überdeckt wurde. Dadurch konnte die Verpilzung des Futters verhindert werden, dagegen wurde die Flüssigkeit durch Agarpartikel, die infolge der Fresstätigkeit der Milben losgelöst worden waren, getrübt und von einer Kahmhaut überzogen.

γ) Filtrierpapierböden.

Die Zucht auf feuchtem Filtrierpapier, sowie auf andern Papiersorten kommt für exakte Versuche nicht in Frage. Störend wirkt vor allem die Schwierigkeit, faulende Hefe und andere Verunreinigungen nicht entfernen zu können. Auch ist eine Kontrolle der im Filtrierpapier tatsächlich vorhandenen, für die Entwicklung der Milben bedeutungsvollen Hefekonzentration nicht möglich. Ausserdem bohren sich die Jugendstadien oft in das aufgeweichte Papier hinein, so dass sie der Kontrolle ebenfalls entzogen sind.

VOL. 35 1954

Weitere besondere Zuchtmethoden, die mit speziellen Versuchsanordnungen gekoppelt sind, werden bei der Besprechung der betreffenden Experimente angeführt.

3. Zuchttemperaturen.

Ausser den Zuchten, die der Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Entwicklung dienten, sowie der Stammzuchten, welche der Zimmertemperatur ausgesetzt waren, wurden die Milben im Thermostaten bei 25° C gehalten, zum Teil auch bei 30—32°, wenn die Entwicklungsgeschwindigkeit aus irgend einem Grunde beschleunigt werden musste. Jene Temperatur wurde aus praktischen Gründen gewählt, weil die am Anfang zur Verfügung stehenden Thermostatenräume für die Drosophilazuchten auf der Standardtemperatur von 25° gehalten wurden. Erst nachdem für die Milbenversuche ein eigener Thermostat reserviert werden konnte, wurde es möglich, die für die Milbenentwicklung optimale Temperatur von 30—32° anzuwenden. Trotzdem wurde in der Regel die Temperatur von 25° beibehalten, um einen eventuellen Temperatureinfluss auszuschalten, der die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse beeinträchtigt hätte.

4. Materialgewinnung und Versuchskontrolle.

Das Herausholen der „Futtermilben" aus den Stammzuchten geschieht durch Auswaschen. Durch mehrmaliges Dekantieren der Aufschwemmung werden die gröbsten Verunreinigungen entfernt, hierauf die Milben mittels einer Pipette auf ein Filtrierpapierstreifchen gebracht, von wo sie mit einem feuchten Pinsel auf den Versuchsboden übertragen werden.

Das Ansetzen von Versuchszuchten kann so geschehen, dass Adulti direkt in die Versuchsschale gesetzt und nach ungefähr einem Tag, wenn genügend Eier abgelegt worden sind, wieder entfernt werden. Das hat allerdings den in den meisten Fällen schwerwiegenden Nachteil, dass zwei wertvolle Tage verloren gehen, bis die Eier gelegt und die Larven ausgeschlüpft sind. Auch wird durch die Adulten der Boden frühzeitig zerfressen. d.h. die glatte, übersichtliche Oberfläche wird zerstört. Und schliesslich ist eine Kontrolle der Anzahl der zu Beginn des Versuches vorhandenen Eier unmöglich. Mit Vorteil werden deshalb für die Eiablage besondere Schalen verwendet, die entweder bereits den gleichen Boden wie die Versuchsschalen enthalten oder aber mit einem hefearmen Agarboden versehen sind, dessen Oberfläche länger sauber bleibt. Die Eier oder Larven werden dann in die definitiven Schalen umgesetzt.

Das Umsetzen der Versuchszuchten ist eine wesentlich zeitraubendere Angelegenheit, da kein einziges Tier verloren gehen darf und somit jede einzelne Milbe mit einer feinen Uhrmacherpinzette übertragen

werden muss. Es ist dies auch die einzige Möglichkeit, um von der Zahl der umgesetzten Milben ein genaues Bild zu erhalten. Ein Übertragen mit dem Pinsel kommt nur in den seltenen Fällen bei noch harter, glatter Futteroberfläche in Frage, wobei aber zugleich unverantwortlich viel des Pilz- und Bakterienbelages mitübertragen wird.

Für ein einwandfreies Auszählen der Experimente (S. 132) kommt nur das Entfernen der betreffenden Milben mit der Pinzette in Frage. Das ist deshalb notwendig, weil nie alle Tiere im gleichen Entwicklungsstadium stehen und somit ein nur einmaliges Auszählen der Schale unmöglich wird. Um einzelne Tiere nicht doppelt zu zählen und um das Auftreten einer zweiten Generation nach Möglichkeit zu verhindern, müssen die registrierten Tiere eben entfernt werden.

Schwieriger gestalten sich die gleichen Manipulationen mit den „Drosophilamilben" wegen ihrer Kleinheit und vor allem wegen ihrer Behendigkeit. Eine Narkose dieser Tiere ist im Prinzipe möglich, die praktische Durchführung zeitigt aber vor allem bei der Auszählung von Experimenten Unzulänglichkeiten, hauptsächlich deshalb, weil viele Individuen selbst auf geringe Dosen von Narkotika sehr empfindlich sind und sterben. Dagegen kann man sich die positive Phototaxis der „Drosophilamilben" zunutze machen. In schräg von oben belichteten Schalen steigen die Milben an den Deckel, wo sie abgestreift bzw. gezählt werden können. Sollen „Drosophilamilben", welche die Deutonymphen der „Futtermilben" sind (S. 114), im gleichen Alter und in bekannter Anzahl zur Verfügung stehen, so kommt nur folgende, sehr zeitraubende Methode in Betracht, die zudem in der Regel nur beschränkte Mengen liefert: In speziellen Schalen lassen wir grosse Mengen von Larven sich entwickeln. Ein gewisser Teil davon liefert Deutonymphen (S. 130). Diese können im Torpor bereits als solche erkannt und mit der Pinzette in die Versuchsschale übertragen werden. Auch das Auszählen der Deutonymphen geschieht mit Vorteil, solange sie sich noch im Torpor befinden, was aber aus zeitlichen Gründen nicht immer möglich ist.

VOL. 35 1954

B. COPULA UND PARTHENOGENESE.

Der besondere Kopulationsporus der *Acaridiae* kann verschiedene Lage aufweisen. Bei den meisten Arten liegt er hinter dem After in der Gegend des caudalen Köperpoles, bei anderen ist er mehr oder weniger auf die Dorsalseite verschoben. Bei *H. laboratorium* ist das in extremer Weise der Fall (Abb. 20, 22). Die Kopulationsstellung ist durch diese Gegebenheiten bedingt. Das Männchen steigt von hinten auf den Rücken des Weibchens und reitet auf seinem grösseren Geschlechtspartner mit diesem gleichgerichtet. Das Weibchen lässt sich dadurch nicht stören, sondern geht weiterhin der Futtersuche nach. Wie lange die erfolgreiche Kopulation dauert, ist

ungewiss, da einerseits solche Reiterstellungen ganz verschieden lange andauern und anderseits nie gesagt werden kann, ob bei der eingenommenen Kopulationsstellung eine Begattung erfolgte. Die Kopulationsstellung kann bei Störungen jederzeit ohne Verzögerung gelöst werden. Das beruht darauf, dass keine besondere Hafteinrichtungen vorhanden sind. Die Stellung wird lediglich durch die Klemmwirkung der Beine des Männchens gesichert. Diese werden dadurch in ihrer Wirkung unterstützt, dass die Bauchseite bei den Männchen flacher ausgebildet ist als bei den Weibchen, so dass ein besseres Anschmiegen möglich wird. Grosse Männchen vermögen die Weibchen von der Seite her mit den Beinen richtig zu umklammern, sodass auch ohne Haftvorrichtung eine feste Verbindung zustande kommt.

Viele Milbenarten weisen eine Besonderheit, eine Art Neotenie auf, indem an der Kopulation nicht das adulte Weibchen, sondern das vorhergehende Stadium, die Tritonymphe teilnimmt. Einige ältere Autoren (z.B. KRAMER 1891, MÉGNIN 1873) haben darum irrtümlicherweise ein „begattungsfähiges" Weibchen und ein „eierlegendes" oder „völlig reifes" Weibchen unterschieden also angenommen, dass es sich bei der letzten Häutung weniger um eine Entwicklungshäutung als um eine solche des „erwachsenen" Tieres handelt. Weder liegen bei den Tritonymphen „Adulti" vor, welche ja fortpflanzungsfähige, also auch eierlegende Weibchen sein müssen, noch zeigen diese Milben echte Neotenie, bei welcher Jugendstadien alle Funktionen der Adulten übernommen haben. Es ist ein Zwischending, vielleicht eine Station auf dem Wege zur Neotenie.

Bei *H. laboratorium* wird ebenfalls bereits die Tritonymphe begattet. Die anatomische Grundlage — Kopulationsporus, Receptaculum seminis — ist vorhanden. Weibchen, die nur als Tritonymphe mit Männchen zusammengehalten werden, zeigen fast durchwegs, eben dann, wenn eine erfolgreiche Kopulation stattgefunden hat, den Erfolg der Befruchtung (s.u). Daneben sind aber auch noch die adulten Weibchen begattungsfähig.

Häufig können Männchen beobachtet werden, die auf anderen Männchen die Kopulationsstellung eingenommen haben, selbst wenn, wie das die Regel ist, die Weibchen in grosser Überzahl vorhanden sind. Es können sich sogar Türme von drei, vier Männchen bilden. Es zeigt dies, dass für das Zustandekommen der Kopulationsstellung keine spezifisch sexuellen Reize notwendig sind, sondern höchstens indifferente Berührungsreize, die dann eintreten, wenn ein Männchen zufällig über ein anderes Individuum hinwegläuft und es mit seiner Bauchseite den anderen Körper wahrnimmt. Diese Annahme wird durch eine weiter Beobachtung gestützt. Männchen können noch so nahe an einem Weibchen vorbeiziehen, sie können es sogar streifen und realisieren trotzdem nicht die Anwesenheit eines Geschlechtspartners. Wenn also tatsächlich nur unspezifische taktile Reize auslösend wirken, dann müsste es mög-

lich sein, dass Männchen auch mit artfremden Individuen Kopulationsversuche unternehmen würden. In unseren Stammzuchten traten sporadisch andere Tyroglyphiden auf, nie aber konnte ein Männchen von *H. laboratorium* in Kopulationsstellung mit einer andersartigen Milbe gesehen werden. Meines Erachtens ist das aber kein Gegenbeweis, sondern eine Stütze für das oben Gesagte. Die fremden Tyroglyphiden unterscheiden sich nämlich für den Tastsinn sicher erheblich von *H. laboratorium*. Die Beborstung ist verschieden, möglicherweise ist auch die Beschaffenheit der Cuticula eine andere, in den meisten Fällen liegt auch ein merklicher Grössen- und Formunterschied vor usw. Das Fehlen von artspezifischen Geschlechtsreizen, die ja der Sicherung der Fortpflanzung zu dienen haben, ist bei *H. laboratorium* verständlich: Das Weibchen ist nicht darauf angewiesen, von einem Männchen gefunden zu werden. Es legt auch ohne Begattung entwicklungsfähige Eier ab, aus denen parthenogenetisch Männchen entstehen. Je grösser die Anzahl der Männchen wird, um so grösser wird die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Kopulation und zur Abgabe von befruchteten Eiern kommt, die sich ausnahmslos zu Weibchen entwickeln. Das Vorhandensein dieser arrhenotoken Parthenogenese, bei der nur die Männchen, diese aber immer parthenogenetisch entstehen, gestattet also den Verzicht auf besondere, das Zustandekommen der Begattung sichernde sexuelle Reize.

VOL. 35 1954

C. EIGELEGE.

H. laboratorium ist ovipar. Ein Weibchen liefert durchschnittlich 120—150 Eier, gleichgültig, ob es sich dabei um befruchtete oder unbefruchtete Eier handelt. Es können aber auch weit mehr Eier abgelegt werden. Es wurden Zahlen über 200, einmal sogar 310 Eier festgestellt. Das hängt von der Lebensdauer der Tiere ab (S. 114). Viele Milben kommen, besonders in den kleinen Zuchtschalen, durch Unglücksfall frühzeitig um, sodass Eizahlen zwischen 200 und 300 nicht als seltene Extremfälle zu bezeichen sind. Sicher spielt auch der Ernährungszustand der Milbe eine Rolle, denn gerade die oben erwähnten 310 Eier wurden im Laufe einer Woche abgelegt, während sich sonst die Ablage von rund 150 Eiern über ca. 14 Tage erstreckt.

Die Eier werden einzeln abgelegt. Die Milben ziehen für die Eiablage Stellen des Futterbodens, die kleine Unebeneheiten, Löcher, Risse u. dgl. aufweisen, einer völlig glatten Unterlage vor. Wenn es die Konsistenz des Bodens erlaubt, werden die Eier immer etwas in diesen hinein gedrückt. Auf Glas werden die Eier durch eine gallertige Masse festgeklebt, die offenbar ein Sekret des Eileiters darstellt.

Die Eier haben die Form eines Ellipsoides und besitzen eine glatte, irisierende Schale, welche etwas dehnbar ist. Dadurch wird ein beschränktes

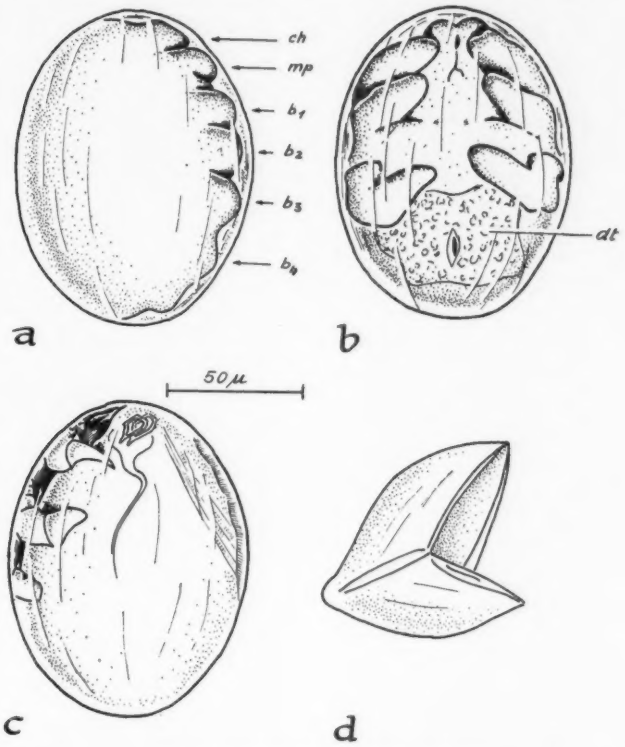


Abb. 28. Embryonalentwicklung. a) Junger Embryo mit Extremitätenanlagen. Seitenansicht. *ch* Chelicere, *mp* Maxillipalpus (Pedipalpus), b_{1-4} Bein I—IV. b) Embryo nach Rückbildung des IV. Beinpaares. Extremitäten noch ungegliedert. Ventralansicht. *dt* Dotter. c) Schlüpfreife Larve. Seitenansicht. Beachte die feine Behaarung und den Verlauf des Oesophagus! d) gesprengte Eihülle.

Wachstum des Embryos innerhalb der Eischale möglich. Eier im Furchungsstadium weisen eine Länge von 100 µ und eine Breite von 78 µ auf, solche mit weit entwickelten Embryonen sind meist etwas grösser und können Masse von 126 µ Länge und 98 µ Breite erreichen. Die abgelegten Eier enthalten bereits wohlausgebildete, aber verschieden alte Embryonen (Abb. 28 b, c). Schon hier beginnt sich die starke Variabilität, welche die ganze Ontogenese charakterisiert, bemerkbar zu machen.

D. EMBRYONALENTWICKLUNG.

Die Furchung der centrolezithalen Eier sowie die Embryonalentwicklung wurde nicht untersucht. Trotzdem möchte ich hier eine diesbezügliche Beobachtung erwähnen, die zwar nicht prinzipiell Neues, wohl aber eine Bestätigung eines für alle Acariden postulierten Verhaltens bringt.

Die aus dem Ei schlüpfende Larve besitzt nur drei Beinpaare, also ein Paar weniger

als alle übrigen Stadien. Bei allen anderen Arachnoideen zeigt bereits das erste Jugendstadium sämtlich Beine. Verschiedene Autoren sahen darin einen Grund, die *Acari* völlig aus dem Verbande der Spinnentiere herauszulösen. Bald konnte aber an verschiedenen Milben gezeigt werden (SICHER 1891, SUPINO 1895), dass die Sechsfüssigkeit der Larven einen sekundären Zustand repräsentiert. Infolge bestimmter Umlagerungsbewegungen des Embryos kommt es nachträglich zu einer Druckeinwirkung auf die letzte Beinanlage, was zu einer Hemmung und Rückbildung dieser Anlage führt. Erst bei der Häutung zur Protonymphe vermag die Beinanlage wieder auszuwaschsen (REUTER 1909). Die Abb. 28a zeigt das entsprechende Verhalten bei *H. laboratorium*.

Durch den Schlüpfakt geht die embryonale in die postembryonale Entwicklung über. Die Eihülle springt offenbar an prädestinierten Stellen auf, denn es entsteht immer dasselbe, in Abb. 28d dargestellte Bild der leeren Eihülle. Im Laufe einer halben bis einer Minute arbeitet sich die Larve aus der Hülle heraus.

E. POSTEMBRYONALE ENTWICKLUNG.

1. Stadienfolge und Entwicklungszeit (Abb. 29).

Die postembryonale Entwicklung von *H. laboratorium* weist vier obligate, durch je eine Häutung getrennte Stadien auf. Es sind das die sechsbeinige Larve, zwei achtbeinige Nymphen und der Adultus. Sie sind von weisslicher Farbe und stimmen, abgesehen von der Grösse und von der Extremitätenzahl der Larve mit derjenigen Form überein, die wir ursprünglich als „Futtermilbe" kennen gelernt haben; sie sind also gleichgestaltet oder homoiomorph. Die erste Nymphe ist anfänglich gleich gross, häufig sogar etwas kleiner als die Larve. Das hat seine Ursache darin, dass das für die Ausbildung des vierten Beinpaares benötigte Material von der übrigen Körpersubstanz abgezogen werden muss. Die adulten Tiere zeigen keinen Cuticulawechsel mehr.

Von einer gewissen Anzahl der Individuen, in der Regel aber nicht von allen, wird noch ein weiteres Stadium durchlaufen, das in Gestalt, Färbung und Lebensweise von den anderen abweicht; es ist also andersgestaltet oder heteromorph. Dieses Stadium haben wir am Anfang als „Drosophilamilbe" eingeführt. Wenn sie ausgebildet wird, tritt sie immer zwischen den beiden homoiomorphen Nymphen auf, so dass sie als zweite Nymphe, als Deutonymphe und die anschliessende homoiomorphe Nymphe als Tritonymphe bezeichnet werden muss. Drei Nymphenstadien bilden — das gilt auch für die Milben im allgemeinen — den ursprünglichen, vollständigen Entwicklungsgang, der bei *H. laboratorium* von vielen Individuen durch Verlust des mittleren Stadiums abgekürzt wird.

Die Deutonymphe ist durchwegs kleiner als die Protonymphe, aus der sie her-

VOL. 35 1954

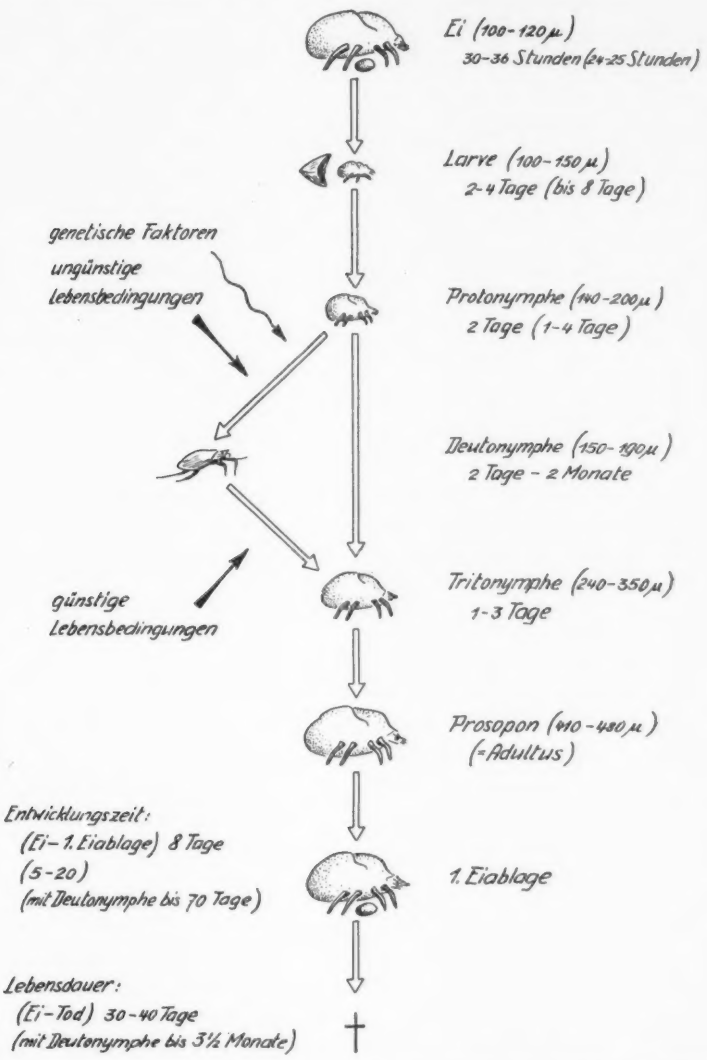


Abb. 29. Entwicklungsgang von *H. laboratorium*. Die Dauer der einzelnen Entwicklungsstadien schwankt stark (Extremwerte in Klammern).

vorgegangen ist (S. 129). Sie kann bereits am folgenden Tag die nächste Häutung einleiten, bleibt aber auch über längere Zeit am Leben und entwicklungsfähig. Es wurden Deutonymphen über zwei Monate gehalten, doch braucht dieser Zeitraum noch nicht mit der maximalen Dauer dieses Stadiums identisch zu sein. Wahrscheinlich vermögen verschiedene Individuen noch länger auszuhalten. HANNA SCHULZE (1924) vermochte Deutonymphen von *Caloglyphus*

mycophagus sieben Monate am Leben zu erhalten und den unbeweglichen Hypopus II (S. 130) von *Tyroglyphus farinae* über neun Monate. Die ebenfalls immobile Deutonymphe von *Glycyphagus spinipes* überdauert bis zwei Jahre.

Die verschiedenen Entwicklungsstadien haben verschiedene Aufgaben zu erfüllen. Die Larve sowie die homoiomorphen Nymphen synthetisieren die für den Aufbau der Organe, vor allem des Genitalsystemes notwendigen Stoffe; sie fressen. Die heteromorphe Deutonymphe dient der Artverbreitung. Sie ist dazu sehr geeignet (S. 118), da sie vom Nährsubstrat unabhängig und zur aktiven und passiven Lokomotion besonders befähigt ist und eine enorme Widerstandsfähigkeit gegen Trockenheit, Temperatur, mechanische und chemische Einflüsse verschiedenster Art, ultraviolette Strahlen u.a.m. besitzt. Man könnte sie mit den Dauerformen anderer Tiere vergleichen, ein Vergleich, der vor allem bei extrem heteromorphen, cystenförmigen, unbeweglichen Deutonymphen, z.B. von *Glycyphagus domesticus* eine gewisse Berechtigung hat. Die Aufgabe der Adulten ist Artvermehrung.

Die in der Abb. 29 beigefügten Grössenangaben zeigen, dass die Körpergrösse stark variiert. Das liegt daran, dass infolge der Dehnbarkeit der Cuticula während den einzelnen Stadien (ausgenommen das Deutonymphenstadium) ein Grössenwachstum möglich ist (S. 87). Es kommt also nicht, wie das z.B. bei Insektenlarven der Fall ist, zu einer sprunghaften Vergrösserung bei den Häutungen, sondern zu einem mehr oder weniger kontinuierlichen Wachstum. Es ist daher nicht möglich, auf Grund einer Grössenbestimmung die Zuordnung zu einem bestimmten Stadium vorzunehmen. Da sich die Nymphen auch nicht durch gut erkennbare, äussere Merkmale unterscheiden, ist eine sichere Stadienbestimmung nur auf Grund einer genauen Entwicklungskontrolle des Einzeltieres möglich.

In der Abb. 29 ist die Dauer der einzelnen Stadien angegeben, wobei der Torpor (S. 128) einbezogen ist. Die Zahlen geben die bei 25° C üblichen Werte an, während die unter normalen Zuchtbedingungen auftretenden Extremwerte in Klammer gesetzt sind. Das Charakteristische dieser Zeiten ist ihre grosse und unkontrollierbare Schwankung, die nicht nur auf verschiedenen Kulturbedingungen beruht. Individuen aus demselben Stundengelege derselben Milbe, die in der gleichen kleinen Schale auf homogenem Futterboden, also unter denselben Bedingungen gehalten werden, weisen in der Entwicklung zum Teil enorme Differenzen auf. Es kann vorkommen, dass die einen Milben bereits zur Eiablage schreiten, während ihre Geschwister noch auf dem Nymphen- oder sogar Larvenstadium stehen. Diese Inkonstanz stellt für die Durchführung von Experimenten, welche die Entwicklung betreffen, ein grosses Hindernis dar.

VOL. 35 1954

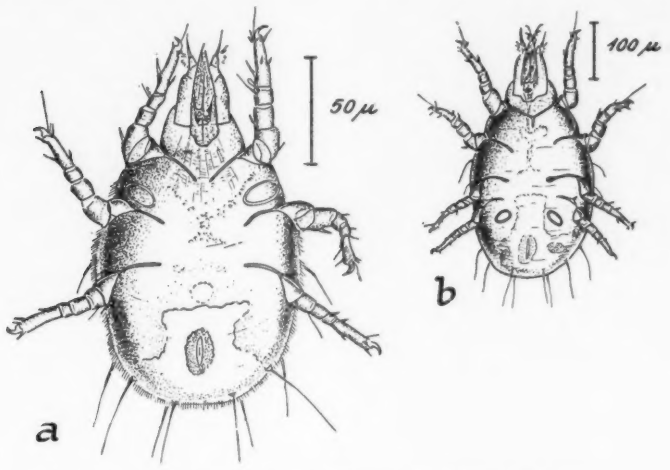


Abb. 30. a) Larve, b) Protonymphe. Ventralansichten.

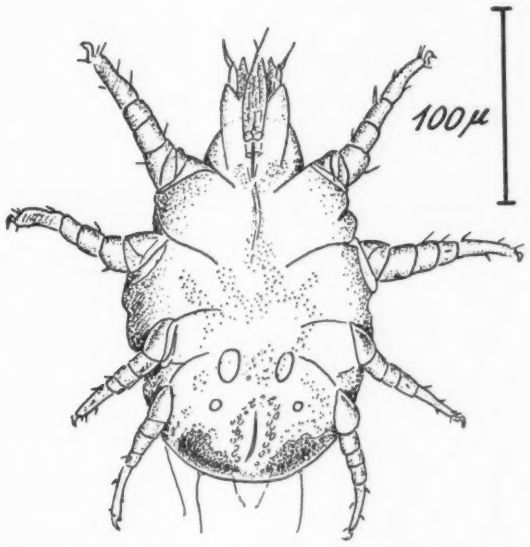


Abb. 31. Tritonymphe, Ventralansicht. Dieses Individuum ist aus einer Deutonymphe hervorgegangen und zeigt deshalb noch eine geringere Körpergrösse als die Photonymphe der Abb. 30 b (s. S. 129.)

Die Ontogenese von *H. laboratorium* lässt viele Fragen offen. Zwei davon wurden näher untersucht, nämlich der Fragenkomplex der Parthenogenese (S. 129) und die Frage nach den Ursachen des Entwicklungsganges mit alternativer Reaktionsnorm (S. 130).

2. Die heteromorphe Deutonymphe.

Die Deutonymphe zeigt den gleichen prinzipiellen Aufbau wie die übrigen Stadien (S. 75 ff.). Der Heteromorphismus kommt lediglich durch mehr oder weniger starke Abwandlungen und Spezialisationen des Bauplanes zustande. Diese Besonderheiten sollen hier besprochen werden.

a) *Morphologie* (Abb. 1a; 32).

Die Körperlänge wird von HUGHES (1950) im Durchschnitt mit 180 μ (160—200 μ) angegeben, was mit unseren Messungen übereinstimmt. Die durchschnittliche Breite beträgt 140 μ und variiert von 120 bis 160 μ.

Der Körper der Deutonymphe ist schildförmig, die Dorsalseite konvex gebogen, während die Ventralseite eine leichte Konkavität aufweist, die hauptsächlich dadurch zustande kommt, dass die Seitenränder etwas nach unten ausgezogen sind (Abb. 1a). Das ganze Tier ist stark gepanzert und weist eine bräunliche Färbung auf. Die Panzerung der Rückenseite besteht aus zwei durch eine Querfurche getrennte, schildförmige Platten; die grössere überdeckt das Hysterosoma und weist feine, in Längsreihen angeordnete Einbuchtungen auf, die kleinere liegt über dem Propodosoma. Die Verbindung zum einheitlichen Bauchschild wird durch ein schmales Stückchen dehnbarer, dünner Cuticula hergestellt, wie das auch zwichen den beiden Rückenschildern der Fall ist. Diese hellen, wenig chitinisierten Streifen werden besonders deutlich, wenn die toten Milben aufquellen, bis sie fast kugelförmig werden (Abb. 35). Die Apodemen sind sehr stark entwickelt. Durch die Vereinigung von Apodemen kommt es in der Medianlinie zur Ausbildung eines starken cranialen Sternums und eines caudalen Ventrums (S. 87).

Die Anordnung der Körperhaare entspricht im Typus derjenigen der Adulti (s. HUGHES 1950), nur sind die Borsten sehr kurz, fast dörnchenförmig.

Das Gnathosoma ist rudimentär, zeigt gar keine Gliederung in irgend welche abgrenzbare Mundgliedmassen, sondern stellt lediglich eine zylindrische Vorwölbung dar, die in zwei stumpfe Kegel ausläuft, die ihrerseits je eine lange, dünne Borste tragen (S. 123).

Die Beine sind lang ausgezogen. Ihre Gliederung ist nur bei den Beinen I und II deutlich, während bei den Beinen III und IV die Gliedergrenzen verwischt werden. Femur und Patella aller Beine sind gegeneinander aktiv und wahrscheinlich auch passiv nicht mehr beweglich, dürften also nicht mehr als echte Glieder bezeichnet werden (S. 81). Die Tarsen I—III tragen eine unpaare Kralle. Es sind das, vor allem I und II, die eigentlichen Schreitextremitäten; das letzte Beinpaar wird nur nachgeschleppt. Es ist aber trotzdem noch aktiv beweglich und wird in Ruhelage häufig unter den Bauch nach vorn ge-

VOL. 35 1954

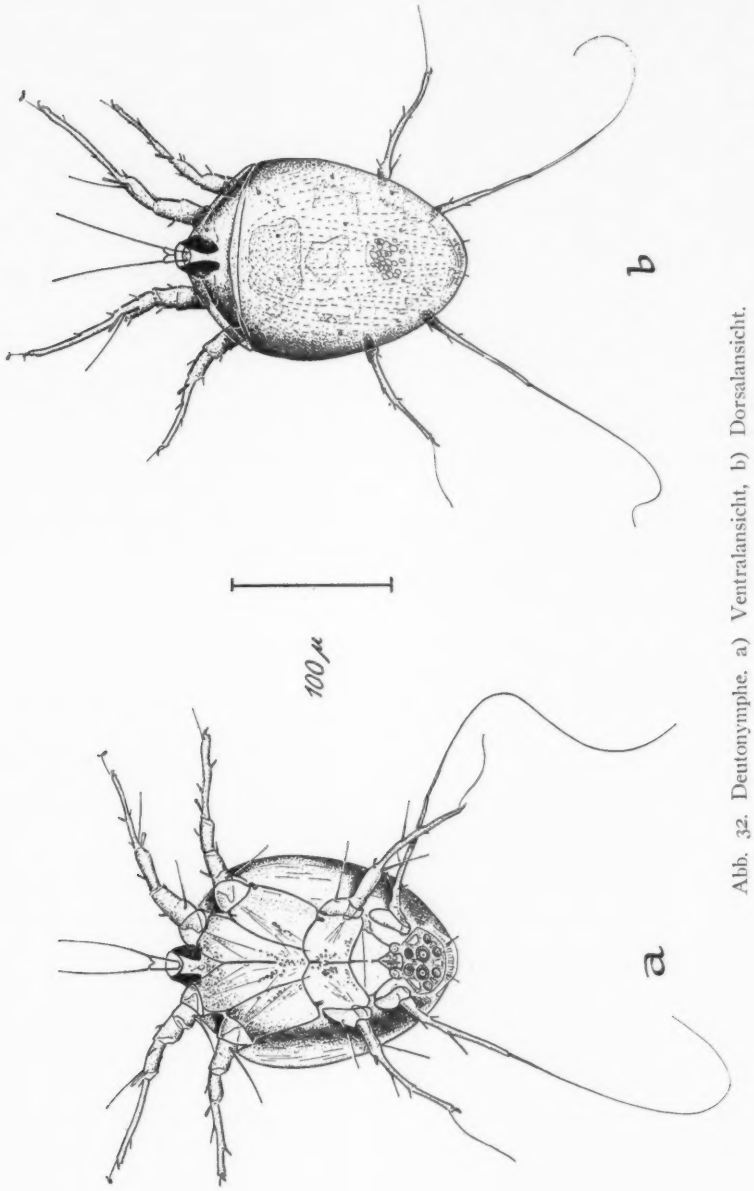


Abb. 32. Deutonymphe. a) Ventralansicht, b) Dorsalansicht.

klappt. Ausser der Kralle trägt der Tarsus distal ein Haargebilde, das bei den einzelnen Beinen eine verschiedene Ausbildung zeigt. Beim Tarsus I ist die Borste am Ende in Form eines Golfschlägers blattartig verbreitert (Abb. 33). Am Tarsus II liegt eine mittellange, schlanke Borste vor, der am Bein III ein

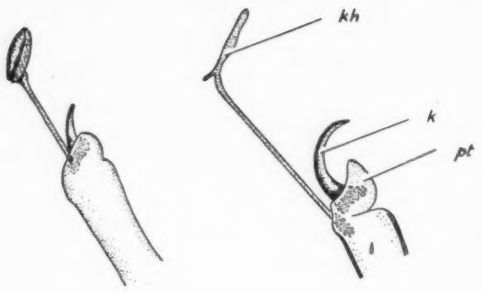


Abb. 33. Distales Ende des Tarsus I der Deutonymphe mit Kralle (*k*), Klebhaar (*kh*) und Praetarsus (*pt*).

längeres, schlankes und biegsames Haar entspricht. Der krallenlose Tarsus IV läuft in einen sehr langen, sich verjüngenden Endfaden aus. Hier allerdings ist es fraglich, ob es sich um eines den erwähnten Borsten entsprechendes Gebilde handelt. Ähnliche Strukturen bei anderen *Acaridiae*, z.B. *Fusohericia incredibilis*, sind weniger stark ausgezogen und besitzen am Ende eine kleine, aber deutlich erkennbare Kralle und müssen daher als Praetarsus bezeichnet werden (S. 81). Es scheint mir daher wahrscheinlicher, dass es sich bei dem langen, krallenlosen Endfaden bei *H. laboratorium* um einen extrem ausgebildeten Praetarsus handelt, der an den anderen Beinen wie bei den Adulten manschettenförmig ausgebildet ist (Abb. 33).

VOL. 35 1954

b) *Anatomie.*

a) Haftmechanismen.

Die Deutonymphen heften sich an die Drosophilafliegen fest. Zu diesem Zwecke sind sie mit „Klebhaaren" und Saugnäpfen ausgerüstet.

Als „Klebhaar" funktioniert der lange Endfaden am Tarsus IV. Er erhöht die Adhäsion zwischen Milbe und Chitinpanzer der Fliege. Ob diese Adhäsion nur auf der Kapillarität bzw. auf der Klebwirkung von Nährsubstratresten, die am Faden hängen, beruht, oder ob noch zusätzlich ein Klebsekret ausgeschieden wird, steht nicht fest. Ähnlich wirkt auch das Haar am Tarsus III. Hughes (1950) kann nicht entscheiden, ob die blattförmig verbreiterte Borste am Tarsus I als Haft- oder als Sinnesorgan anzusprechen sei. Bei den heteromorphen Deutonymphen anderer *Acaridiae*-Arten treten gleiche Haare in grösserer Zahl und auch an den anderen Beinen auf und dienen dort offensichtlich dazu, das Ausgleiten auf glatten Cuticulaflächen zu verhindern. Das gleiche Haargebilde bei *H. laboratorium* darf daher als Klebhaar bezeichnet werden.

Besonders wirksame Haftorgane sind die Saugnäpfe, die bei *H. laboratorium* zu einer Haftnapfplatte vereinigt sind. Diese nimmt den grössten Teil der Unterseite des kurzen Opisthosomas ein (Abb. 32 a). Am auffälligsten und grössten ist das in der Abb. 34 mit (n_1) bezeichnete Haftnapfpaar.

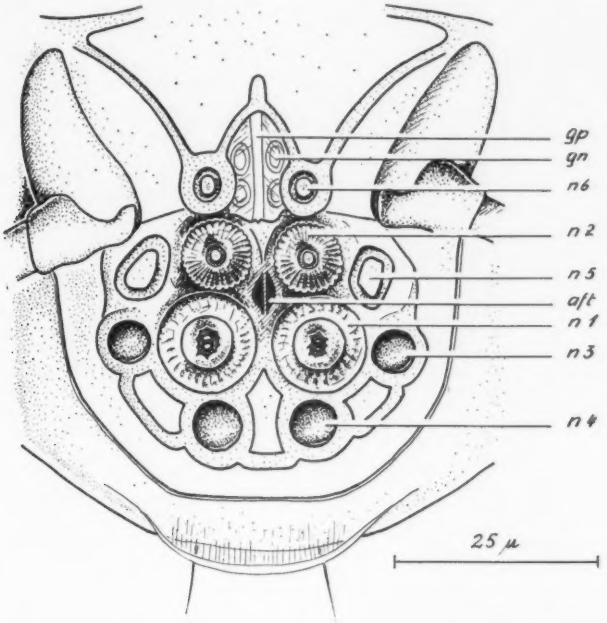


Abb. 34. Haftnapfplatte der Deutonymphe. *a* After, *gp* Geschlechtsporus, *gn* Genitaltaster, n_1 Hauptsaugnapf, n_2 vorstreckbarer Saugnapf, n_{3-4} kleine seitliche und hintere Saugnäpfe, n_5 rudimentärer Saugnapf, n_6 vorderster Saugnapf.

Seine Saugnäpfe besitzen je einen kräftigen Ringwulst, dessen Zentrum von einer kegelförmigen Vorwölbung eingenommen wird (Abb. 35 b). Es scheinen dies die kräftigsten Näpfe zu sein, die beim angehefteten Tier die Hauptarbeit leisten werden. Cranial vor diesen liegen zwei mittelgrosse, radiär gestreifte Saugnäpfe (n_2), die im Gegensatz zu den ersteren, die nur sehr wenig vorgestreckt werden können, weit (15 μ) vom Körper abgehoben und sogar etwas bewegt werden können (Abb. 35 a). In der Ruhelage liegen sie ebenfalls dicht dem Körper an. Die Vorstülpung erfolgt wahrscheinlich nach dem Turgorprinzip, denn bei Deutonymphen, die aufquellen, werden diese Haftnäpfe maximal eregiert. Sie stellen den ersten Kontakt mit der Fliege her, worauf sie durch Einziehen den Körper so nahe an die Oberfläche der Fliege heranpressen, dass auch die anderen Saugnäpfe in Aktion treten können. Neben und hinter dem grossen Napfpaar (n_1) befinden sich vier kleine Saugnäpfe (n_3) und (n_4). Sie zeigen nicht mehr das typische Aussehen von Haftorganen, wie das bei anderen *Acaridiae* noch der Fall ist, so dass angenommen werden kann, dass sie nur noch von untergeordneter Bedeutung, eventuell sogar funktionsunfähig sind. Vergleichende Untersuchungen zeigen nämlich, dass bei stärkerer Ausbildung der beiden grösseren Napfpaare (n_1) und (n_2) die übrigen entsprechend rückgebildet werden. Zu diesen rückgebildeten Näpfen

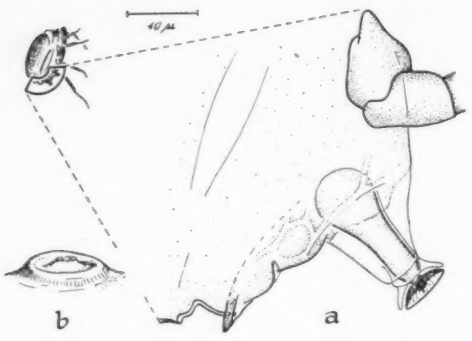


Abb. 35. Haftnäpfe in Seitenansicht. a) n_2, b) n_1 (vgl. Abb. 34).

gehören auch die beiden lateral der Saugnäpfe (n_2) gelegenen Ringstrukturen (n_5). Sie zeigen wohl noch eine radiäre Streifung, gleichen sonst aber in nichts funktionierenden Saugeinrichtungen. Als Saugnäpfe überhaupt nicht mehr erkennbar sind die hinten zwischen (n_3) und (n_4) gelegenen, hellen Areale. Diese sollen nach GRANDJEAN (cit.n. VITZTHUM 1940/43) ebenfalls ehemalige Saugorgane darstellen. Die vor der Haftnapfplatte liegende, rudimentäre Genitalspalte (gp) wird von zwei weitern, kleinen Haftnäpfen (n_6) flankiert. Es steht fest, dass dieses letzte Haftnapfpaar, sowie die mit (n_3) und (n_4) bezeichneten umgewandelte Haare sind. Einerseits geht das aus vergleichend-morphologischen Untersuchungen hervor, anderseits konnte nachgewiesen werden, dass sie auch Actinochitin (S. 89) enthalten, was für bestimmte Haartypen charakteristisch ist (GRANDJEAN, cit. VITZTHUM 1940/43). Die Adulti von *H. laboratorium* besitzen auf dem Hysterosoma 26 wohl ausgebildete Borsten. Die Deutonymphe weist nur 22 kümmerliche Haare auf (s. HUGHES 1950). Es fehlen die vier hintersten Haare, welche in die vier caudalen Saugnäpfe (n_3) und (n_4) umgewandelt worden sind.

β) Übrige Organe.

Über das Verhalten der Eingeweide bei der Deutonymphe von *H. laboratorium* kann nicht viel ausgesagt werden, da keine Schnitte angefertigt wurden. Es konnte lediglich bestätigt werden, dass wie bei den verwandten Formen eine mehr oder weniger weitgehende Rückbildung verschiedener Organsysteme vorliegt.

Von der Muskulatur ist diejenige der Extremitäten gut ausgebildet, während die auf den Körper beschränkten Muskelzüge z.B. dorsoventrale Muskeln weitgehend rudimentär sind.

Das Darmsystem ist am stärksten reduziert. Wir haben schon gesehen, dass das Gnathosoma sehr vereinfacht ausgebildet ist. Es zeigt ausserdem keine Mundöffnung. Die übrigen Teile scheinen, soweit sie nicht ganz fehlen, als mehr oder weniger kompakte Zellhaufen ohne deutliches Lumen ausgebildet zu sein. Einzig der Enddarm hat wenigstens in

VOL. 35 1954

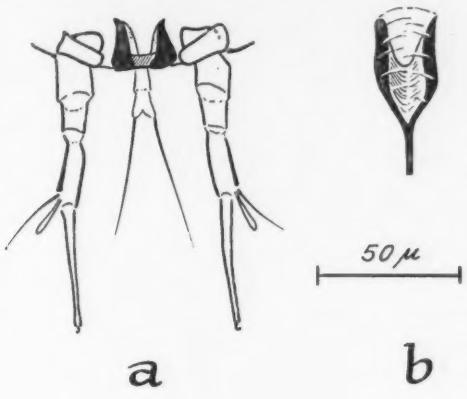


Abb. 36. Pigmentrinne der Deutonymphe. a) Ansicht von vorn; Beine und Gnathosoma sind nach unten gerichtet, b) Ansicht von dorsal.

seinem letzten Abschnitt eine Lichtung, welche in der sehr kleinen, inmitten der Haftnapfplatte gelegenen Afterspalte (Abb. 34) mündet.

Das Nervensystem soll völlig normal sein. Auch das Genitalsystem wird von der Reduktion nicht erfasst sondern bleibt auf dem Stadium der Protonymphe stehen. Der auf der Ventralseite vor der Haftnapfplatte befindliche Genitalspalt verläuft sowohl bei den zukünftigen Männchen als auch bei den zukünftigen Weibchen (die übrigens auf dem Deutonymphenstadium äusserlich nicht unterscheidbar sind) in sagittaler Richtung. Auf den seitlichen Genitalklappen sitzen zwei Paar Genitaltaster (Abb. 34 gn), die den homoiomorphen Stadien fehlen (S. 90; 103).

Ihrer lebhaften Lebensweise entsprechend sind die Sinnesorgane zum Teil besser ausgebildet als bei den Erwachsenen. Am auffallendsten demonstriert sich der Lichtsinn. Die Deutonymphen zeigen ausgesprochene positive Phototaxis. Es muss also ein Richtungssehen vorliegen. Eigentliche Augen sind aber nicht ausgebildet, wie das z.B. bei *Tyroglyphopsis ocellata* Vitzthum der Fall ist. Ausser dem lichtempfindlichen Teil, der wahrscheinlich mit dem „Gehirn" identisch ist, existiert eine schwarz pigmentierte, abschirmende Hilfseinrichtung. Diese stellt eine mit den Epimeren I in Verbindung stehende Cuticularrinne oder -röhre dar, deren Ventralseite mässig, deren lateralen Wände aber sehr stark verdickt und pigmentiert sind (Abb. 36), während die dorsale Bedeckung dünn und durchsichtig ist und vielleicht mit der Rückencuticula zusammenfällt. Der lichtperzipierende Anteil muss in dieser Rinne liegen und wird nur von cranio-dorsal durch das Licht ungehindert getroffen; von caudo-dorsal eintreffende Lichtstrahlen sind weniger wirkungsvoll, da sie noch den Rückenschild durchdringen müssen (Abb. 32 a).

Als Tastsolenidien (S. 89) werden die beiden Fäden, in welche das Gnathosoma ausläuft, sowie die lange Borste auf der Tibia I (Abb. 37 *ts*) angesprochen. Diese ist sowohl beim Marschieren als auch in der Ruhelage

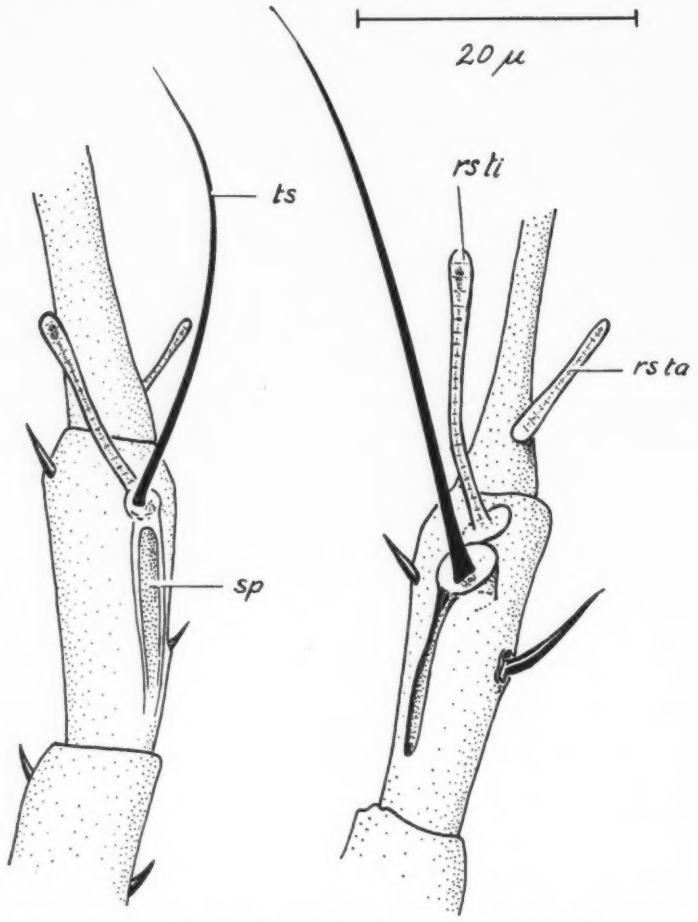


Abb. 37. Sinnesorgane am Bein I der Deutonymphe. *rs ti* Riechsolenidium der Tibia, *rs ta* Riechsolenidium des Tarsus, *sp* Spaltorgan, *ts* Tastsolenidium.

immer weit nach vorn gerichtet, während die Fäden des nach unten geklappten Gnathosomas auf dem Untergrund schleifen (S. 146).

Dicht neben der langen Tastborste befindet sich auf der Tibia I ein als Riechzapfen umgebildetes Solenidium. Ein ähnlicher Zapfen befindet sich am proximalen Ende des Tarsus II. An der entsprechenden Stelle des Tarsus I steht ein noch kleineres, gleichgestaltetes Gebilde (Abb. 37 *rsta*). Schon lange wurde vermutet, dass es sich bei diesen Zapfen der Tyroglyphiden um Geruchsorgane handle. HALLER fand dann 1880 bei einer Trombidiumart ähnliche Zapfen und 1881 bei Zecken entsprechende, allerdings andersgestaltete Gebilde, die er als Otocysten, Gehörorgane ansprach. HINDLE und MERRIMAN (1912/13) und nach ihnen TOTZE (1933) konnten aber experimentell zeigen, dass

VOL. 35 1954

es sich bei dem „Haller'schen Organ" auf dem Tarsus I der Zecken um ein Geruchsorgan handelt und dass ausser diesem keine weiteren Geruchsrezeptoren vorhanden sind. Bei den *Rhagidiidae* (*Trombidiformes*) kommen homologe Organe in etwas anderer, im Prinzip aber gleicher Ausführung vor, die zudem noch auf Tarsus II zu finden sind. An den homologen Stellen treten nun bei den Tyroglyphiden die erwähnten Zapfen oder Kolben auf. Auf Grund dieser Homologien und der Befunde von HINDLE und MERRIMAN wird angenommen, dass diese Gebilde Riechkolben sind. Es soll nicht überraschen, dass dasselbe Organ in den einen Fällen grubenförmig (Zecken, *Rhagidiidae*), in den anderen Fällen als Kolben ausgebildet ist, denn die Haargebilde der Milben sind zu den extremsten Umformungen fähig, wie wir schon bei den Saugnäpfen gesehen haben. Der grosse Riechkolben auf Tibia I befindet sich nicht an einer der erwähnten homologen Stellen (Tarsus I bzw. II). Sein Aufbau (S. 89) ist aber genau der gleiche wie derjenige der anderen Kolben, so dass er ohne weiteres mit diesen gleichgesetzt werden kann.

Im Anschluss an die beiden grossen, verschieden gestalteten Solenidien der Tibia I befindet sich ein längs gerichteter Spalt (Abb. 37 *sp*). Solche Spaltorgane gibt es bei vielen Milben teils am Körper, teils an den Gliedmassen. Bei den *Acaridiae* treten sie nur an der Tibia I und seltener zugleich noch auf Tibia II auf. Bei *H. laboratorium* besitzt nur die Deutonymphe auf der Tibia I das erwähnte Spaltorgan, während die homoiomorphen Stadien eines solchen entbehren. *Notostigmata* und *Mesostigmata* (*Parasitiformes*) haben an den Cheliceren in der Gegend des Ansatzes der beiden Digiti ebenfalls Spaltorgane. Ob die in Abb. 8a dargestellte Struktur (sp) eine entsprechende Einrichtung ist, kann ich nicht entscheiden. Wenn es stimmt, dass das kleine Anhängsel den rudimentären Digitus mobilis repräsentiert (S. 84), dann würde jedenfalls die Lage jener Struktur derjenigen der Spaltorgane der erwähnten Milbengruppen entsprechen. Über die Funktion der Spaltorgane ist nichts bekannt; sie werden als Sinnesorgane aufgefasst, könnten aber nach VITZTHUM (1940/43) ebensogut Drüsen sein.

c) *Lebensweise.*

Die Deutonymphen von *H. laboratorium* klammern sich mit ihren Haftvorrichtungen an Drosophilafliegen fest. Da sie keine Nahrung aufzunehmen vermögen (Fehlen des Mundes, Reduktion des Darmes), kann es sich nicht um Parasitismus handeln. Dass tatsächlich keine Nahrungsaufnahme stattfindet, kann auch durch Verabreichen von gefärbtem Futter gezeigt werden: die homoiomorphen Stadien werden angefärbt, die Deutonymphen aber nicht. Entwickeln sich Deutonymphen aus vitalgefärbten Protonymphen, so erscheint ihr ganzer Fettkörper ebenfalls gefärbt (Abb. 40). Die Anheftung an die Fliegen ist vorüber-

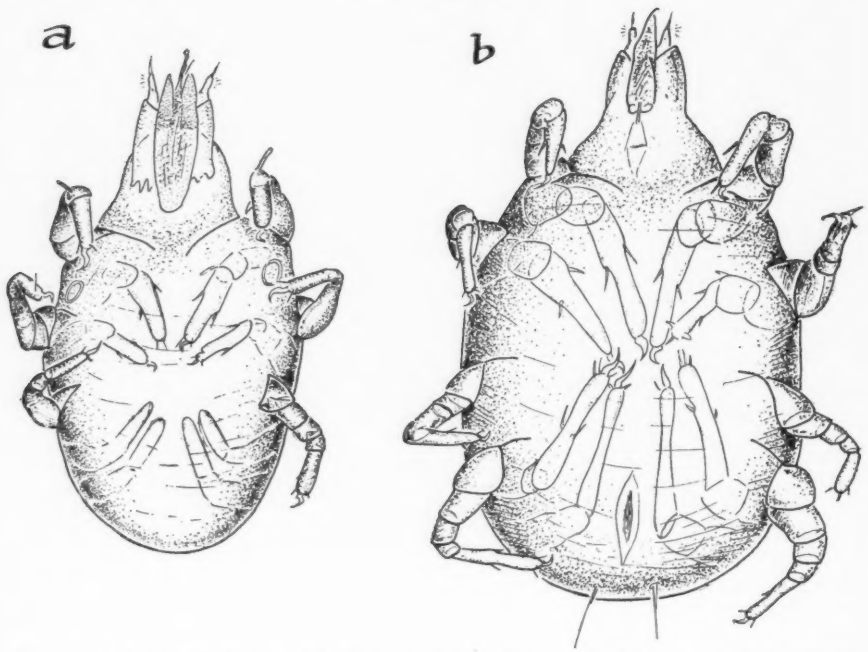


Abb. 38. a) Larve im Torpor, b) Protonymphe im Torpor, Ausbildung der Tritonymphe.

VOL. 35 1954

gehender Natur und geschieht lediglich zum Zwecke des Weitertransportes (sog. Phoresie). Mit den Fliegen gelangen die Deutonymphen auf neue Futterquellen, wo sie jene verlassen und sich weiter entwickeln können. Die Deutonymphen vermögen gutes, reichliches Futter geruchlich zu erkennen (S. 145), so dass neben einem zufälligen auch ein aktives, „gewolltes" Verlassen des Transporttieres angenommen werden kann.

Im Gegensatz zu den Zecken, welche ihre Wirtstiere auf Distanz „wittern" und sich dementsprechend verhalten (Totze 1933, Hindle und Merriman 1912/13), scheinen die Deutonymphen von *H. laboratorium* ihre Transporttiere nicht als solche zu erkennen. Von einem gerichteten Aufsuchen konnte nie etwas gesehen werden. Die Milben gelangen rein zufällig auf die Fliegen. Sie werden lediglich durch mechanische Störungen wie Berühren, Herumschieben durch irgendwelche Gegenstände (Fliegenbein, Pinzette usw.) auf die Anwesenheit z.B. einer Fliege aufmerksam gemacht. Wenn sie vorher in Ruhe der Unterlage angeheftet sind, braucht es oft recht massive Störungen, bis es zu einer Reaktion kommt. Diese besteht darin, dass sie sich aufrichten und versuchen, mit den vorderen Beinen das störende Ding

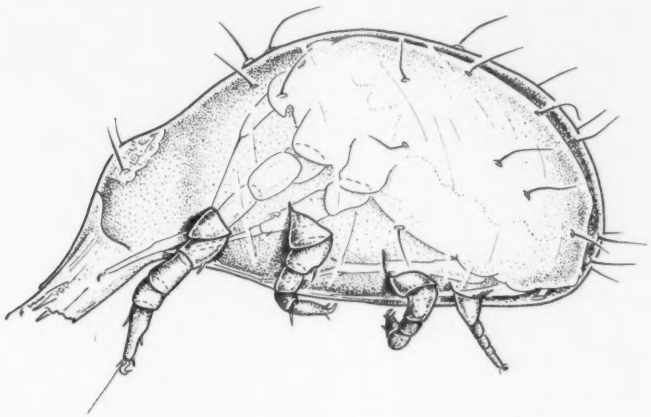


Abb. 39. Protonymphe im Torpor, Ausbildung der Deutonymphe.

zu ergreifen und sich daran empor zu ziehen. Die Fliege reagiert meist mit heftigen Putzbewegungen, die häufig erfolgreich sind.

Es fragt sich nun, warum trotz des Fehlens eines spezifischen Erkennens des Transporttieres nur auf *Drosophila* Deutonymphen von *H. laboratorium* gefunden werden. Das liegt erstens daran, dass sich ihre Biotope offenbar weitgehend decken oder dass zum mindesten Fliegen und Milben die gleiche Futterquelle besitzen (Symphagium). Zweitens zeigen beide Tiere starke positive Phototaxis, d.h. die Deutonymphen häufen sich dort an, wo ein Zusammentreffen mit den Fliegen wahrscheinlicher ist.

Die Deutonymphen leben nur von ihren Reserven. Es ist daher erstaunlich, dass sie sogar Monate überdauern können. Das gelingt ihnen nur, indem sie tage- und wochenlang am gleichen Ort liegen bleiben, wodurch der Umsatz beträchtlich herabgesetzt, die Reserven geschont und die Lebensdauer stark verlängert werden kann. Individuen, die durch ständigen Lichtwechsel und andere Einflüsse immer wieder zur Lokomotion und zu intensivem Bewegen veranlasst werden, zeigen durch zunehmende weissliche Färbung eine starke Vermehrung des Guanins und dadurch indirekt eine Steigerung des Stoffumsatzes an, wodurch ihre mögliche Lebensdauer stark herabgesetzt wird.

3. Häutungen.

Bei den Häutungen der Milben handelt es sich nicht nur um einen durch das Grössenwachstum bedingten Wechsel der Cuticula. Es erfolgt zugleich ein weitgehender Umbau, ein Einschmelzen und Wiederaufbauen einzelner Organe. Der Umbau beginnt schon während der Dauer des vorhergehenden Stadiums und umfasst hauptsächlich die Muskulatur, in geringerem Masse einzelne Darmabschnitte (Mitteldarm), vielleicht auch die Speicherniere, wäh-

Abb. 40. Fettkörper und Speicherniere der Deutonymphe. Schwarz: Fettkörper der Dorsalseite. Schraffiert: Fettkörper der Ventralseite. Punktiert: Speicherniere. Die übrigen Körperstellen sind durchsichtig und lassen die Apodemen der Ventralseite und Muskelzüge erkennen.

VOL. 35 1954

rend Nervensystem und Genitalapparat davon nicht berührt werden sollen. Er vollzieht sich vor allem während eines immobilen Ruhezustandes (Torpor), der ein bis zwei Tage, manchmal auch länger dauert und wenn immer möglich nicht auf der Futteroberfläche, sondern im Substrat eingegraben verbracht wird. Die Extremitäten werden infolge der fortschreitenden Histolyse aus ihren Cuticulahüllen zurückgezogen. Sie liegen als anfänglich ungegliederte Stummel der ebenfalls von der Cuticula abgelösten Ventralseite an und werden langsam wieder zu gegliederten Beinen ausgebildet. Der Körperinhalt wird zunächst trübe und strukturlos und lässt erst mit dem Fortschreiten der Reorganisation die Organe wieder erkennen. Der Raum zwischem dem zurückgezogenen Milbenkörper und der alten Cuticula ist von einer Flüssigkeit erfüllt, in welcher Amöbozyten und kleinere Partikel, die Brown'sche Molekularbewegungen ausführen, beobachtet werden können. Die ersteren stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Histolyse, die kleinen Partikel könnten Exkrete (Guanin) sein, welche auf diesem Wege aus der Speicherniere freigesetzt würden. Bei den *Tarsonemini* (*Trombidiformes*) soll es bei den Häutungen auf diese Weise zur Abgabe von Exkreten kommen (Vitzthum 1940/43). Wenn das bei *H. laboratorium* auch zuträffe, dann würde auf alle Fälle niemals alles Guanin entfernt, denn frisch gehäutete Milben zeigen bereits eine mit Guanin gefüllte Speicherniere. Die alte Haut wird normalerweise in einem Querspalt gesprengt, sodass immer eine zweigeteilte, sonst aber intakte Exuvie entsteht.

Ob sich eine Protonymphe in eine Deutonymphe oder direkt in eine Tritonymphe umwandelt, kann im Torpor bald erkannt werden. Wenn die

heteromorphe Deutonymphe ausgebildet wird, erscheint die Protonymphe praller und anfänglich stärker milchig getrübt. Später reichert sich die Trübung im caudalen Teile an, während der craniale Teil zunehmend heller und schliesslich klar und durchsichtig wird. Aus den im caudalen Teil angesammelten Zellmassen geht allmählich die sich entwickelnde Deutonymphe hervor (Abb. 39). Diese ist kleiner als die Protonymphe und braucht zu ihrer Bildung einen um ein bis mehrere Tage länger dauernden Torpor als die anderen Stadien. Das ist zu verstehen, denn einerseits werden die Organe weit stärker umgebildet als bei den übrigen Häutungen und anderseits wird das durch die Verkleinerung gewonnene Material als Betriebsreserve in den Fettkörper eingebaut. Diese gestattet den Deutonymphen, ohne Nahrungsaufnahme wochenlang zu leben.

V. DIE GESCHLECHTSBESTIMMUNG.

Unbegattete Weibchen von *H. laboratorium* legen Eier, die sich ausnahmslos zu Männchen entwickeln, begattete Weibchen solche, aus denen in der überwiegenden Mehrzahl Weibchen entstehen. *H. laboratorium* zeigt somit arrhenotoke Parthenogenese (S. 112). Es wäre jetzt zu untersuchen, ob haploide Parthenogenese vorliegt und ob die Männchen selbst auch haploid sind, oder ob während ihrer Ontogenese eine Aufregulierung zur diploiden Chromosomenzahl stattfindet.

Die Lösung dieser Fragen könnte auf genetischem und cytologischem Wege gesucht werden. Nun ist aber *H. laboratorium* aus verschiedenen Gründen (Fehlen von Pigmenten, Kleinheit und Durchsichtigkeit der Borsten, Variabilität der Entwicklungszeiten, Zuchtschwierigkeiten u.a.m.) für den Nachweis von erblichen Veränderungen sehr ungeeignet. Ich konnte daher auch keine Mutationen nachweisen. Für die cytologischen Untersuchungen wurden Schnittpräparate (Methode S. 86), sowie Quetsch- und Ausstrichpräparate verwendet. Bei den letzteren wurden ganze Milben ausgequetscht, da das Herauspräparieren einzelner Organe schwierig ist. Dabei wirkt sich die Speicherniere sehr hindernd aus, da die Guaninkristalle das ganze Präparat überschwemmen und eine Untersuchung praktisch verunmöglichen. Gefärbt wurde mit Karminessigsäure und mit Orceïn.

Alle diese Untersuchungen verliefen negativ. Die Kerne sämtlicher Organe, so auch diejenigen der Nervenzellen, die sonst bei anderen Tieren neben den Gametenvorstufen Chromosomenuntersuchungen am ehesten erlauben, sind von hoffnungsloser Kleinheit. Chromosomen wurden überhaupt nicht gesehen.

Dort, wo bis jetzt bei Milben Chromosomen beschrieben werden konn-

ten, erscheinen sie als sehr kleine, kugelförmige Elemente. Unter den Tausenden von Milben sind nur für folgende Spezies die Chromosomen bekannt: *Ixodes reduvius* (NORDENSKIOELD 1909), drei, eventuell sechs *Gamasus*-Arten (SOKOLOW 1934), *Tetranynchus bimaculatus* (SCHRADER 1923), *Pediculopsis graminum* (REUTER 1909), *Pediculoides ventricosus* (PÄTAU 1936). Es handelt sich dabei um Milben, die für die Präparation besonders günstig sind.

Uns interessieren diejenigen Fälle, welche ebenfalls Arrhenotokie zeigen. Es sind das die zu den *Trombidiformes* gehörenden *Tetranynchus bimaculatus, Pediculopsis graminum* und *Pediculoides ventricosus*. Bei *P. ventricosus* sind die Männchen tatsächlich haploid, die Weibchen diploid ($2n = 6$). Dasselbe soll für *P. graminum* zutreffen ($2n = 4$ nach REUTER, $2n = 6$ nach COOPER 1937). Bei *T. bimaculatus* konnte SCHRADER (1923) bis zum Blastodermstadium, zum Teil auch bei 2—3 Tage alten Embryonen und bei einigen Larven die Chromosomenzahlen feststellen: unbefruchtet (= Männchen) 3, befruchtet (= Weibchen) 6. Die übrigen Stadien ergeben nur undeutliche Bilder, welche höchstens eine Schätzung zulassen. Es scheint also, dass auch in diesem letzten Falle bei den Männchen keine Aufregulierung zur diploiden Zahl stattfindet.

Für *H. laboratorium* müssten gleiche Verhältnisse erwartet werden. Diesbezügliche Untersuchungen dürften nach unseren Erfahrungen am ehesten an isolierten Furchungs- und Blastodermstadien zum Ziele führen.

VOL. 35 1954

VI. BEEINFLUSSUNG DER POSTEMBRYONALEN ENTWICKLUNG DURCH AUSSENFAKTOREN.

In der Ontogenese der *Acaridiae* ergeben sich durch das Auftreten der heteromorphen Deutonymphe besonders interessante Probleme. Es ist verständlich, dass die ersten bekanntgewordenen Deutonymphen nicht als solche erkannt, sondern irrtümlicherweise als eigene Milbenarten beschrieben wurden. So hat DUGÈS 1834 einige dieser Formen in die besondere Gattung *Hypopus* zusammengefasst, während DUFOUR 1839 andere Deutonymphen als *Trichodactylus* beschrieb und KOCH 1843 eine weitere Gattung *Homopus* aufstellte. Erst MÉGNIN (1873 a, b, 1874) bewies, dass die Hypopoden nichts anderes als gepanzerte, „zusätzliche" und heteromorphe Nymphen der *Acaridiae* sind, welche der Verbreitung der Art zu dienen haben. Er erkannte also, dass Hypopus (wie auch Homopus und Trichodactylus) keine Gattung, sondern ein Entwicklungsstadium ist, verwendete aber fortan bewusst diesen Gattungsnamen als Bezeichnung für das heteromorphe, zweite Nymphenstadium.

Die Ausbildung der Deutonymphe bei den *Acaridiae* zeigt mannigfache Variationen. Erstens ist der Grad des Heteromorphismus verschieden. Neben Deutonymphen, die sich von den homoiomorphen Stadien nur wenig unterscheiden (*Histiogaster entomophagus* Lab.) gibt es solche, die extremen Heteromorphismus zeigen (*Glycyphagus*). Zweitens finden wir auch in Bezug auf die Mobilität der Hypopoden alle Übergänge von äusserst beweglichen (*Histiostoma laboratorium*) biz zu völlig bewegungsunfähigen Formen (Hypopus II von *Tyroglyphus farinae*). Und drittens zeigt

auch die Regelmässigkeit des Auftretens in der Ontogenese unterschiedliches Verhalten. Bei *Histiogaster berghii* durchläuft jedes Individuum dieses Stadium. Bei anderen Arten, z.B. *Histiogaster corticalis* bilden fast durchwegs alle Individuen eine Deutonymphe aus, während bei *Histiogaster entomophagus* beinahe alle dieses Stadium überspringen. Und schliesslich gibt es Spezies, welche das zweite Nymphenstadium gänzlich verloren haben (z.B. *Tyrolichus casei*).

Der ganze Fragenkomplex um die Entstehung der heteromorphen aus der ursprünglich homoiomorphen Deutonymphe, sowie deren allmähliche Unterdrückung im Entwicklungsgang, ist in der Literatur als „Hypopusfrage" bekannt. Fast alle diesbezüglichen Arbeiten sind älteren Datums und behandeln anatomische, systematische oder phylogenetisch-theoretische Fragen. Ein vollständiges Literaturverzeichnis darüber findet sich bei H. SCHULZE (1924 b), über die historische Entwicklung orientieren MÉGNIN (1873) und MICHAEL (1884) und eine vorzügliche, nachfolgend zusammengefasste Deutung und Diskussion gibt REUTER (1909).

Ursprünglich waren alle Stadien homoiomorph. Infolge der Trägheit und grossen Vermehrungsrate der Milben entstehen auf kleinem Raume sehr dichte Populationen, was sehr bald zu einer Erschöpfung der Nahrungsquelle führt. Ein Jugendstadium übernahm dann hauptsächlich die Aufgabe der Artverbreitung. Dass dies das mittlere Nymphenstadium ist, scheint verständlich: die Larve benötigt den grösten Teil des synthetisierten Materials zum Ausbau des vierten Beinpaares (S. 114) der Protonymphe, so dass diese nach der Häutung noch nicht über genügend Reservestoffe verfügt, um als Wanderform in Frage zu kommen (S. 127); anderseits braucht es zum Aufbau des umfangreichen Geschlechtsapparates der Adulti weiteres Material, das erst durch ein Jugendstadium, das zur Nahrungsaufnahme befähigt ist (Tritonymphe), beschafft werden muss. Die Artverbreitung durch die Deutonymphe geschieht dadurch, dass diese beweglichere Tiere als „Omnibus" (MÉGNIN 1874) benützt. Während des Transportes gerät sie unter andere ökologische Bedingungen. Durch Selektion kommt es zur Ausbildung der an diese Bedingungen besser angepassten, heteromorphen Deutonymphen. Die bei allen Milben vorhandene Tendenz zur Abkürzung des Entwicklungsganges hat bei den *Acaridiae* das mittlere Nymphenstadium erfasst (REUTER). Es bereitet nun allerdings etwelche Mühe, zu verstehen, warum gerade dieses widerstandsfähige, wichtige Stadium unterdrückt werden soll. H. SCHULZE (1924 a) glaubt darum mit Recht, dass es sich weniger um eine „Rückbildung" im Sinne eines Anfanges zur allmählichen Unterdrückung des Stadiums, sondern um eine bessere Anpassung an die gegebenen Lebensverhältnisse der verschiedenen Milbenarten handelt.

Welche Stellung innerhalb der erwähnten Übergangsreihen nimmt nun die Deutonymphe von *H. laboratorium* ein? Wie wir bereits gesehen haben, ist ihre Aktivität sehr gross. Der Heteromorphismus ist ebenfalls stark ausgeprägt. In der Regel wird sie nicht von allen Individuen ausgebildet, ist aber in den Populationen immer zu finden. Das zahlenmässige Auftreten zeigt beträchtliche Schwankungen. Vor allem kann in alten Zuchten ein gehäuftes Vorkommen konstatiert werden. Offenbar wird die Ausbildung der Deutonymphe durch „ungünstige" Aussenfaktoren im Sinne einer Förderung beein-

flusst (Abb. 29). In den folgenden Experimenten interessiert uns die diesbezügliche Reaktion des Individuums auf die Umwelt.

Unter allen Bedingungen treten — bei genügend grossen Populationen — Deutonymphen auf. Es können daher nicht Einzeltiere geprüft werden, sondern nur Populationen, bei denen der Prozentsatz der gebildeten Deutonymphen bestimmt wird (Methode S. 109). Bei „günstigen" Bedingungen sollte also ein geringer, bei „ungünstigem" Milieu ein hoher Prozentsatz zu erwarten sein. Dabei muss berücksichtigt werden, dass eventuell nur scheinbar ein vermehrtes Auftreten der Deutonymphen vorliegen kann, indem nämlich bei schlechten Bedingungen die empfindlichen, homoiomorphen Stadien eher zu Grunde gehen als die widerstandsfähigen Deutonymphen! Diese Fehlerquelle wurde so unter Kontrolle gehalten, dass eine genau bekannte Zahl von Eiern bzw. Larven in die Versuchschalen eingesetzt wurde.

Neben diesem ersten Entwicklungsschritt von der Protonymphe zur Deutonymphe ist aber auch der folgende von der Deutonymphe zur Tritonymphe von Interesse. Es zeigt sich nämlich, dass bei „günstigen" Bedingungen die Umwandlung der Deutonymphe eher vor sich geht (Abb. 29). Die Frage, die uns beschäftigt, lautet daher: Worin bestehen die „ungünstigen Faktoren, die den ersten Schritt beeinflussen, und was hat man sich unter den „günstigen" Bedingungen, welche die Weiterentwicklung der Deutonymphe fördern, vorzustellen?

VOL. 35 1954

A. DIE ENTSTEHUNG DER DEUTONYMPHE.

1. Der pH-Wert des Futters.

Frische Stammzuchten auf *Drosophila*-Standard-Futter zeigen oft ausser den eingesetzten Adulti fast nur Deutonymphen. Dies tritt immer dann ein, wenn durch eine kräftige Gärung des Futters sehr viel Essigsäure produziert wird. Werden frische Stammzuchten mit Essigsäure, Oxal-, Milch- oder Salzsäure getränkt, so sind diese Schalen — sofern die eingesetzten Milben durch die Säure nicht getötet werden — nach wenigen Tagen voll von Deutonymphen. Werden solche Zuchten erst später kontrolliert, so ergibt sich nicht mehr das gleiche eindrückliche Bild, weil sich viele Deutonymphen bereits weiterentwickelt haben, so dass nun auch die homoiomorphen Stadien in vermehrter Zahl auftreten. Augenscheinlich wirkt nicht die Essigsäure an sich, sondern der niedere pH-Wert auslösend.

Für exakte, zahlenmässig erfassbare Versuche wird ein Hefe-Agar-Nährboden (S. 107) verwendet und mittels Pufferlösungen auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt. Dieser wird während der Versuchsdauer mehrmals mit Indikator-Papier kontrolliert. Der Prozentsatz der Deutonymphen wird be-

Tab. 3. *Einfluss des* pH-*Wertes auf die Deutonymphenbildung.* N_2 = *Deutonymphe.*

pH	Schale	Gesamtzahl der ausgezählten Milben	davon % N_2
3,3	I	321	68
	II	262	94
	III	199	55
	IV	68	97
4	I	377	79
	II	390	83
	III	203	61
5,2	I	47	2
	II	92	5
	III	117	32
6	I	95	9
	II	197	58
	III	201	26
7	I	236	58
	II	301	25
	III	63	6
	IV	94	32
	V	80	31
7,6	I	131	58
	II	25	8
	III	49	31
11	I	78	31
	II	102	53
	III	120	54

stimmt, indem alle entstehenden Deutonymphen sukzessive gezählt und ententfernt werden. Individuen, welche das zweite Nymphenstadium überspringen, werden als Adulti registriert. Durch Addition erhält man die Gesamtzahl der Individuen.

Tab. 3 und Abb. 41 veranschaulichen die erhaltenen Werte einer Versuchsserie. Dabei zeigen sich zwei Ergebnisse. Erstens weist der Prozentsatz der Deutonymphen bei gleichem pH-Wert grosse Schwankungen auf, eine Tatsache, die bei allen anderen Experimenten für die einzelnen Klassen ebenfalls konstatiert werden kann. Diese Schwankungen innerhalb einer pH-Klasse werden natürlich noch vergrössert, wenn pro Schale nur wenige Tiere ausgezählt werden können. Es ist deshalb zweckmässig, in jeder Zucht möglichst viele Milben zu halten. Dadurch wird aber die Kontrolle der Versuche sehr erschwert, vor allem, weil das Auftreten weiterer

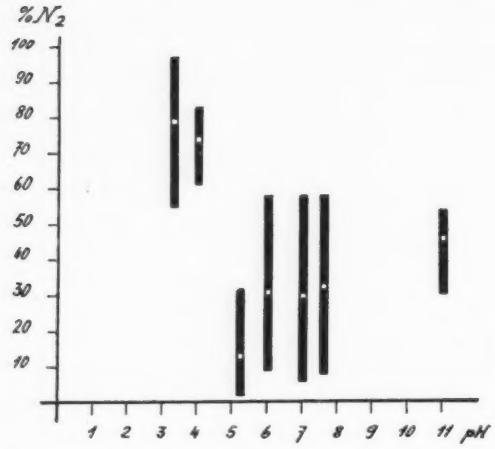


Abb. 41. Graphische Darstellung des Einflusses des pH-Wertes des Futters auf die Deutonymphenbildung (gleiche Werte wie in Tab. 3). Mittelwert der Einzelklasse weiss ausgespart).

Generationen nicht immer verhindert werden kann. Wegen der Variabilität der Entwicklungszeiten (S. 116) können die Generationen unmöglich auseinander gehalten werden, sodass eine zahlenmässige Auswertung illusorisch wird. Diese Schwierigkeiten könnten behoben werden, wenn man unbefruchtete Weibchen, die nur männliche Nachkommen liefern, als Eierlieferanten für die Versuche verwenden würde. Aus zeitlichen Gründen ist es aber ebenfalls unmöglich, genügend unbegattete Weibchen für die Versuche bereit zu stellen. Es bleibt somit nur der Kompromiss, der darin besteht, 100 bis 200 Tiere pro Schale zu halten, so dass einerseits eine genaue Kontrolle noch möglich ist und anderseits die Schwankungen in erträglichem Rahmen bleiben.

Zweitens ergibt sich die Bestätigung der Vermutung, dass im stärker sauren Bereich mehr Deutonymphen entstehen als im schwächer sauren, neutralen und alkalischen Bereich. Die in der Abb. 41 erkennbaren Unterschiede zwischen pH 3 und 4 einerseits und den höheren pH-Werten andererseits sind statistisch gesichert (t-Test). Einen pH-Wert unter 3,3 ertragen die Milben in der Regel nicht. Es ist das derjenige Punkt, der im Drosophilafutter bei kräftiger Gärung häufig für kurze Zeit erreicht und nur ausnahmsweise (S. 171) unterschritten wird; später beginnen bereits Fäulnis- und Verwesungsprozesse einzusetzen, welche den pH-Wert wieder hinaufdrücken.

Bei diesen Säureversuchen traten während wenigen Wochen Milben mit veränderter Körpergestalt auf (Abb. 42). Tiere aus Stammzuchten, die mit den oben angegebenen Säuren behandelt worden waren, zeigten im weiblichen Geschlecht eine dreieckige Gestalt, im männlichen Geschlecht eine mehr viereckige Form mit ausgeprägten „Schultern". Es handelte sich dabei nicht um Schrumpfungen infolge Wasserverlustes, welche ein ganz anderes Bild ergeben und die beim Einlegen der Tiere in Wasser wieder verschwinden, sondern um irreversible Veränderungen. Zuchtversuche ergaben, dass es sich nicht um Mutationen, sondern um nicht erbliche Modifikationen handelte.

VOL. 35 1954

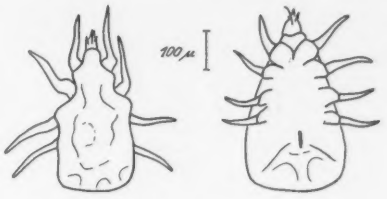


Abb. 42. Abnorme Körpergestalt der Adulti, aufgetreten in Säurezuchten. Links: Männchen, Dorsalansicht. Rechts: Weibchen, Ventralansicht.

2. Säuredämpfe.

Die Anwendung der Säuren in Dampfform hat auf die Ausbildung der Deutonymphe keinen Einfluss. Der Futterboden der in Tab. 4 dargestellten Versuchsserie zeigt durchwegs den durch Pufferlösung eingestellten pH-Wert von 7,6. Die erhaltenen Prozentsätze bewegen sich innerhalb der Streuung bei dieser Wasserstoff-Ionen-Konzentration (Abb. 41). Die den Säuredämpfen exponierten Schalen zeigen hier sogar geringere Werte als die Kontrollzuchten mit Wasserdampf.

Eine scheinbare Wirkung von Dämpfen tritt erst dann ein, wenn zu konzentrierte Dämpfe verwendet werden, die vom Agarboden aufgenommen werden. Sein pH-Wert fällt trotz Puffer, so dass es zur vermehrten Ausbildung von Deutonymphen oder gar zum Absterben der Milben kommen kann.

3. Der Zuckergehalt des Futters (Hypertonie).

H. laboratorium ist zur Osmoregulation befähigt, solange sich die osmotischen Werte des Mediums im biologischen Rahmen halten. Steigt die Hypertonie über diese Grenze, dann versagt die Regulation, die Milben gehen zu Grunde. Der Zucker im Drosophilafutter ist osmotisch wirksam. Werden Stammzuchten mit sehr hohem Zuckergehalt des Futters (zwecks Steigerung der Hefeproduktion) angesetzt, so sterben häufig die eingesetzten Milben in kürzester Zeit. Erst wenn durch die Gärung ein Teil des Zuckers abgebaut worden ist, vermögen sich die Tiere auf dem Futter zu halten. Offenbar ist also zu hoher Zuckergehalt, d.h. Hypertonie des Futters ein für die Milben „ungünstiger" Umweltsfaktor.

Die experimentelle Überprüfung dieser Annahme ist negativ verlaufen, indem keine statistisch gesicherten Unterschiede zwi-

Tab. 4. *Einfluss von Säuredämpfen auf die Deutonymphenbildung bei einem konstanten* pH *von 7,6 des Futterbodens.* N_2 = *Deutonymphe.*

Dämpfe	Wasser		Essigsäure		Salzsäure	
Gesamtzahl	633	483	685	—	762	749
% N_2	58,3	44,9	71,5	—	39,7	45,4

Tab. 5. *Einfluss der Temperatur auf die Deutonymphenbildung. Die eingeklammerten Werte beziehen sich auf Zuchten, die täglich während einigen Stunden auf 25° C gehalten wurden, um die Entwicklung der Milben zu ermöglichen. Ständige Einwirkung der tiefen Temperaturen führt zu Entwicklungsstillstand und Tod.* N_2 = *Deutonymphe.*

Temperatur in C	Gesamtzahl	% N_2
0°	(211)	(44,5)
	(460)	(31,3)
	(284)	(25,0)
6°	(365)	(29,9)
	(178)	(39,5)
	(432)	(54,4)
16°	214	33,6
	158	51,3
	246	49,6
25°	429	60,1
	385	55,5
32°	322	55,3
	200	0,5
	295	34,6
37°	—	—

VOL. 35 1954

schen den verschiedenen Zuckerkonzentrationen auftraten. Über 30 % Zuckergehalt ertragen die Tiere nicht. Auch bei den Hypertonieversuchen auf Salzböden (S. 163), die in anderem Zusammenhang ausgeführt wurden, konnte kein vermehrtes Auftreten der Deutonymphen beobachtet werden.

4. Temperatur.

Schalen mit identischen Futterböden (pH 7) werden auf verschiedenen Temperaturen gehalten. Der zur Verfügung stehende Stufenthermostat gestattete die Anwendung der in der Tab. 5 angegebenen Temperaturen. Zur Eiablage wurden die Adulti bei 25° C gehalten. Nach Entfernen der Adulten gelangten die Schalen in den Stufenthermostaten.

Aus der Tab. 5 geht deutlich hervor, dass weder tiefe noch hohe Temperaturen einen Einfluss auf die Deutonymphenbildung ausüben. Bei 0° und 6° können sich die Milben nicht entwickeln, sie sterben, Dasselbe trifft zu für 37°. Die tiefen Temperaturen führen nicht sofort zum Tode der Milben, sondern nur zur Kältestarre. Einfrieren während 24 Stunden ergibt keine Beeinträchtigung; können sich solche Tiere anschliessend unter normalen Temperaturen entwickeln, dann zeigen sie keine Besonderheiten in der Deutonymphenbildung. Werden diejenigen Milben, die auf 0° bzw. 6° gehalten werden, periodisch auf höhere Temperaturen ge-

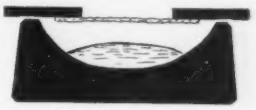


Abb. 43. Zuchtgefäss für Feuchtigkeitsversuche. Schematische Darstellung. Die kreisförmige Öffnung im Deckel ist durch Filtrierpapier dicht verschlossen. Am Grunde des Salznapfes befindet sich der Hefe-Agar-Zuchtboden.

bracht, damit die Entwicklung doch allmählich weitergeführt werden kann, dann zeigen sie trotz den wiederholten Kälteschocks keine vermehrte Ausbildung der Deutonymphen. Die in Tab. 5 eingeklammerten Werte beziehen sich auf diese Fälle.

5. Luftfeuchtigkeit.

Die homoiomorphen Stadien von *H. laboratorium* sind sehr empfindlich auf Abnahme der Luftfeuchtigkeit. Sie verlieren bald Wasser, schrumpfen und gehen zugrunde. Ist der Wasserverlust nicht zu weit fortgeschritten, so sind die Schrumpfungen in feuchter Atmosphäre reversibel. Die Deutonymphen sind viel resistenter gegen Trockenheit. In alten, austrocknenden Zuchten sind in der Regel viele Deutonymphen zu finden. Aus diesen Gründen kann angenommen werden, dass Trockenheit als „ungünstige" Umweltsbedingung par excellence zu gelten hat.

Für die experimentelle Prüfung wurde folgende Versuchsanordnung verwendet: Als Zuchtgefäss dienen Salznäpfchen. Ihre Glasdeckel werden mit einem zentralen Loch von 1 1/2 cm Durchmesser versehen, das durch ein aufgeklebtes Filtrierpapierstückchen verschlossen wird (Abb. 43). Die mit Vaseline gedichteten Deckel verschaffen den sicheren Verschluss und gewähren durch das Filterpapier hindurch den Ausgleich der Luftfeuchtigkeit innerhalb und ausserhalb der Salznäpfchen. Diese werden in einen Exsiccator gesetzt, in welchem über einem Schwefelsäure-Wasser-Gemisch bei 25° eine genau bestimmte Luftfeuchtigkeit herrscht.

In der Tab. 6 sind die Ergebnisse zweier Serien dargestellt. Die kleinen Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollzuchten sind statistisch von keiner Bedeutung. Im t-Test ergeben sich für die Wahrscheinlichkeit P Werte zwischen 0,3 und 0,5. Bei nur 48 % Feuchtigkeit sterben die Milben. Der Feuchtigkeitsgrad, speziell Trockenheit hat also keinen Einfluss auf die Deutonymphenbildung.

Bei Trockenheit kann allerdings eine scheinbare Vermehrung der Deutonymphen auftreten, dann nämlich, wenn es zu einer langsamen, aber ständig fortschreitenden Austrocknung kommt, wobei schliesslich die homoiomorphen Stadien in immer grösserem Ausmasse zugrunde gehen, während die widerstandsfähigen Deutonymphen in unverminderter Zahl vorhanden bleiben. Um diese Fehlerquelle auszuschliessen, wurden in der einen Serie die genauen Zahlen der eingesetzten Eier festgestellt. Da am Ende des Versuches ziemlich genau gleich viele Individuen zur Auszählung gelangten, ist nachgewiesen, dass keine

Tab. 6. *Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Deutonymphenbildung.* N_2 = *Deutonymphe.*

Luftfeuchtigkeit	Gesamtzahl		% N_2
	eingesetzt	ausgezählt	
100 % (1. Serie)	148	150	22
	122	120	11,7
	134	135	5,3
69 % (1. Serie)	100	100	15
	144	144	34,7
	100	88	21,6
48 % (1. Serie)	alle Zuchtschalen ausgetrocknet		
100 % (2. Serie)	—	196	63,2
	—	228	17,9
	—	141	65,9
82 % (2. Serie)	—	187	59,9
	—	105	59,0
	—	137	70,0

Verfälschung durch erhöhte Letalität der homoiomorphen Stadien vorliegt. Besonders die bei 69 % Feuchtigkeit gehaltenen Schalen zeigen zudem, dass auch die starken Schwankungen der Prozentzahlen innerhalb der gleichen Klasse nicht auf verschiedener Letalität in den verschiedenen Schalen beruhen.

VOL. 35 1954

6. Futtermangel.

Alte Zuchten, deren Futter durchwegs schwach alkalisch oder höchstens neutral ist, in denen also nach den pH-Versuchen wenige Deutonymphen auftreten sollten, zeigen meist höhere Prozentzahlen von Hypopoden. Ausser der Wasserstoff-Ionen-Konzentration wirken also noch andere „ungünstige" Faktoren. In Frage kommen chemische Veränderungen des Futterbodens sowohl durch eigene Fäulnisprodukte als auch durch Verwesungsprodukte von zahlreichen Milbenleichen oder dann einfach Futtermangel.

Bei den Versuchen, die den Einfluss des Futtermangels auf die Deutonymphenbildung abzuklären haben, kommt es nicht auf den absoluten, sondern auf den relativen Hefegehalt der Nährböden an. Zu einer bestimmten Agarmenge (5 cm^3) werden 2 bzw. 4 bzw. 8 Tropfen usw. der gleichen Hefeaufschwemmung beigegeben. In Abb. 44 sind auf der Abszisse die Tropfenzahlen eingetragen und sind als Verhältniszahlen der zur Verfügung stehenden Futtermenge zu werten. Die Beigabe von z.B. 64 Tropfen Hefeaufschwemmung zu der relativ kleinen Agarmenge würde zu einer unerwünschten Verdünnung des Agars führen. Die Hefedosierung wird daher so vorgenommen, dass ein sehr konzentrierter Hefebrei durch entsprechende Verdünnungen auf die durch

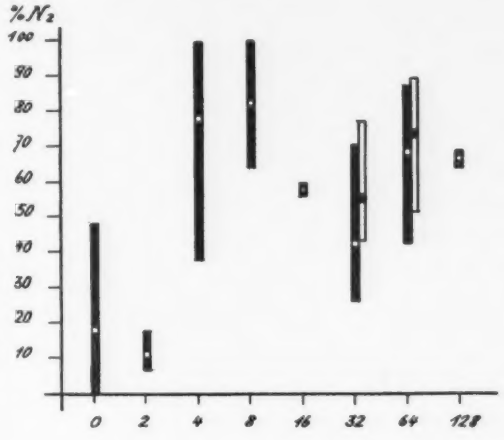


Abb. 44. Einfluss des Futtermangels auf die Deutonymphenbildung. Auf der Abszisse sind die Verhältniszahlen der Futtermenge aufgetragen (vgl. Text), auf der Ordinate die gezählten Deutonymphen (N_2) in %. Schwarz (Mittelwert weiss): 1. Generation. Weiss (Mittelwert schwarz): 1. und 2. Generation.

die Verhältniszahlen ausgedrückten Konzentrationen gebracht wird, sodass in den einzelnen Klassen ungefähr gleich viel Hefewasser dem Agar beigegeben werden muss.

In der Abb. 44 ist das Ergebniss einer Versuchsserie dargestellt. In den Klassen 0 und 2 ist die Ernährung ungenügend; fast alle Tiere zeigen Entwicklungshemmungen und sterben. Von den wenigen Milben, die trotzdem auszuhalten und sich zu entwickeln vermögen, bilden die meisten keine Deutonymphe. Von der Klasse 4 bis zur Klasse 32 ist eine Abnahme der durchschnittlichen Prozentzahlen festzustellen, d.h. je mehr Futter, umso weniger Deutonymphen. Die Unterschiede selbst zwischen den extremen Klassen sind aber statistisch nicht gesichert. In den beiden obersten Klassen, also denjenigen mit dem konzentriertesten Futter treten die Deutonymphen wiederum in höheren Prozentsätzen auf. In diesem hefereichen Futter wirkt sich die Fäulnis viel stärker aus und ist verantwortlich für das vermehrte Auftreten der Deutonymphen. Das wird auch ersichtlich, wenn man neben der ersten auch noch die zweite Generation berücksichtigt. Das ist bei den Klassen 32 und 64 geschehen und zeigt klar, dass sich der Prozentsatz vergrössert, je älter das Futter wird, je länger es den Fäulnisprozessen unterworfen ist.

Andere Serien zeigen noch geringere Unterschiede. Werden Milben auf völlig hefefreiem Agarboden gehalten, wobei die zur Lebenserhaltung unbedingt notwendige Hefemenge täglich durch kleinste Tropfen verdünnten Hefewassers beigegeben wird, so zeigen die nicht zugrunde gehenden Individuen ebenfalls keine vermehrte Deutonymphenbildung.

Futtermangel allein führt also nicht zu vermehrtem Auftreten der Hypopoden, wohl aber in extremen Fällen zu Entwicklungsstillstand und erhöhter Sterblichkeit. Da der Entwicklungsstillstand in den weitaus meisten Fällen

bereits auf dem Larven- oder Protonymphenstadium einsetzt, kommt es auch nicht zu einer nur scheinbaren Vermehrung der Deutonymphen.

7. Fäulnis- und Abbaustoffe.

Die Futtermangelversuche haben gezeigt, dass wahrscheinlich weniger die Quantität als vielmehr die Qualität des Futters wirksam ist. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden verschiedene Experimente in mehreren Serien angesetzt, die aus versuchstechnischen Gründen teilweise nicht ganz einwandfrei durchgeführt werden konnten. So wird einerseits die Gefahr der Fäulnis und Verpilzung des Futters unter den gegebenen Versuchsbedingungen stark erhöht. Anderseits ist es oft fast unmöglich, Material, z.B. Press-Saft von Milben in genügender Quantität zu beschaffen, um grössere Serien ansetzen zu können. Schliesslich ist die Dosierung von Faulhefe, Ammoniak usw. schwierig, die in geringen Dosen wenig oder gar nicht, in etwas höheren Konzentrationen aber bereits als Gifte wirken können.

a) *Faulhefe.*

Sowohl in den Kontrollen wie in den Faulhefeschalen muss frische Hefe, die zur Entwicklung unentbehrlich ist, dem Agar beigegeben werden. Die verfaulte Hefe muss vor der Beigabe sterilisiert werden, da sonst die Fäulnisbakterien die frische Hefe schon am ersten Tage zersetzen würde, so dass in Bezug auf die Nahrungsmenge Unterschiede zu den Kontrollen entstünden. Alle Schalen werden auch mit Pufferlösung versehen, die auf denjenigen pH-Wert eingestellt ist, der für die verwendete Faulhefe charakteristisch ist (pH 8—11). Statt der vollständigen Faulhefelösung kann auch der klare, wässerige Auszug verwendet werden, der durch Sedimentation oder durch Zentrifugieren von den festen Partikeln getrennt worden ist. Die auf beide Arten erzielten Ergebnisse sind identisch. Zu viel Faulhefe wirkt auf die Milben tödlich. Die Dosierung muss für jede einzelne Faulhefelösung empirisch festgestellt werden.

Die in Tab. 7 dargestellten zwei Versuchsserien ergeben keine statistisch gesicherte Unterschiede, weder zu den Kontrollen noch zwischen den beiden Faulhefeklassen. Dass die Zuchten ohne zusätzliche Frischhefe etwas mehr Deutonymphen bilden, könnte — wenn sich bei grösseren Serien gesicherte Unterschiede ergeben würden — auf zwei Arten gedeutet werden: Durch die Frischhefe kommt es zu einer prozentualen Verminderung der in der aufgenommenen Nahrung vorhandenen Faulhefe; in diesem Falle wären tatsächlich Fäulnisprodukte die verantwortlichen Faktoren. Oder aber es könnte das vermehrte Auftreten der Deutonymphen als Effekt des Mangels an vollwertigem Futter betrachtet werden. Es darf auch nicht vergessen werden, dass sich die erhaltenen Prozentwerte innerhalb der Streuung

VOL. 35 1954

Tab. 7. *Einfluss von Fäulnisprodukten auf die Deutonymphenbildung.* N_2 = *Deutonymphen.*

		1. Serie		2. Serie	
		Gesamtzahl	% N_2	Gesamtzahl	% N_2
A	Kontrollen ohne Faulhefe	54	1,9	123	14,2
		übrige Zuchten eingegangen		105	4,0
B	Faulhefe mit frischer Hefe	138	1,5	81	1,2
		129	0,8	111	0,9
		117	8,6		
C	Faulhefe allein	82	15,9	120	5,0
		110	17,3	114	9,7
		101	3,0		
t-Test B/C		P > 0,1		P > 0,1	

bewegen, welche für die betreffenden pH-Werte festgestellt wurden. Ob die in den obigen Versuchen auftretenden kleinen Unterschiede der Mittelwerte trotzdem nicht nur zufälliger Natur sind, können nur grosse Versuchserien entscheiden.

b) *Ammoniak.*

Bei der Zersetzung von Eiweissen entsteht Ammoniak. In alten Zuchten mit ursprünglich grossem Hefegehalt kann oft geruchlich Ammoniak festgestellt werden.

Die Milben sind auf Ammoniak sehr empfindlich. 1 % Ammoniak muss als oberste tragbare Grenze betrachtet werden. Ist mehr vorhanden, dann sterben die Tiere je nach der Konzentration entweder sofort oder im Laufe von zwei bis drei Stunden. Zugleich werden die Öldrüsen, soweit sie mit Sekret gefüllt sind, schwarz gefärbt. Offenbar handelt es sich um eine Fällung, denn der Inhalt ballt sich eng zusammen, vermag aber noch durch das Ausführungsrohr nach aussen zu gelangen. Diese Schwärzung habe ich früher wiederholt in alten Zuchten beobachtet. Sogar in einer frischen Schale starben nach einem Tage alle eingesetzten Milben unter den angeführten Umständen; die für die Zubereitung jenes Futter verwendete Hefe war schon alt und nicht mehr einwandfrei.

In den Versuchen wurden Konzentrationen von 0,1—1 % angewendet. Sie ergaben nur geringe, in einzelnen Schalen überhaupt keine Ausbildung von Deutonymphen. Man darf aus diesen Ergebnissen noch nicht den Schluss ziehen, dass Ammoniak keinen Einfluss auf die Deutonymphenbildung ausübe. Erstens ist die Dosierung so kleiner Prozentsätze des flüchtigen Ammoniaks, der zum noch flüssigen, also warmen Agar gegeben werden muss, praktisch kaum möglich. Zweitens müssen, weil die Milben nur Spuren des Ammoniaks ertragen, Schwellenwert — sofern ein solcher vorhanden ist — und letale Dosis sehr nahe beisammen liegen, so dass ein sicheres und einwandfreies

Einhalten definierter Versuchsbedingungen sehr schwierig und vor allem nicht kontrollierbar ist.

c) *Milben-Press-Saft.*

Die Vermutung, dass chemische Veränderungen des Futters durch Stoffe, die bei der Verwesung toter Milben entstehen, die Ausbildung der Wanderform begünstigen, wurde experimentell überprüft. Die Ergebnisse sind auch hier nicht schlüssig. Grössere Quantitäten von Milben wurden in einem Mikromörser fein zerrieben, die ganze Masse stehen gelassen und dann der Press-Saft dem Agar beigegeben. Ein Teil der Schalen erhielt noch einen Zusatz von Hefe. Bei Individuenzahlen von 100—200 pro Schale ergaben sich bei den Kontrollen 43—59 %, bei den Press-Saft-Zuchten 22 %, 31 %, aber auch 96 %. Wegen dieser starken Streuung konnte ein eindeutiger Nachweis eines Einflusses auf die Deutonymphenbildung noch nicht erbracht werden.

B. DIE WEITERENTWICKLUNG DER DEUTONYMPHE ZUR TRITONYMPHE.

1. Feuchtigkeit.

Die heteromorphen Deutonymphen sind gegen Trockenheit relativ gut geschützt und können in alten, austrocknenden Zuchten häufig gefunden werden. Die übrigen, weichhäutigen Stadien dagegen sind auf Trockenheit sehr empfindlich. Das legt die Vermutung nahe, dass der Feuchtigkeitsgrad für die Ausbildung und Weiterentwicklung der Deutonymphe von Wichtigkeit sei. Wir haben bereits gesehen, dass für den ersten Schritt (Entstehung der Deutonymphe) Trockenheit keine Rolle spielt (S. 137).

Vermag erhöhte Feuchtigkeit die Weiterentwicklung der Deutonymphe zu erzwingen? Bevor die Experimente zur Beantwortung dieser Frage besprochen werden können, müssen noch einige Bemerkungen zur Methode gemacht werden, die für alle folgenden Versuche Gültigkeit besitzen.

Das Deutonymphenstadium kann entweder nur wenige Tage oder aber Wochen und Monate dauern. Diejenigen Individuen, die nicht durch Unglücksfall z.B. Austrocknen ums Leben kommen, häuten sich früher oder später auch dann zur Tritonymphe, wenn sie sich noch im selben ungünstigen Milieu befinden, welches ihre Ausbildung veranlasst oder wenigstens begünstigt hat. Je älter eine Deutonymphe wird, umso grösser ist auch ihre Bereitschaft zur Weiterentwicklung. Wenn ich also Deutonymphen sammle und sie im Experiment irgend welchen Aussenbedingungen aussetze, so wird es immer eine gewisse Zahl von Individuen geben, die innert kürzester Zeit die Häutung auch ohne Änderung der Bedingungen vollzogen hätten. Der Prozentsatz dieser Individuen ist umso grösser, je älter im Durchschnitt die Deutonymphen sind, die

VOL. 35 1954

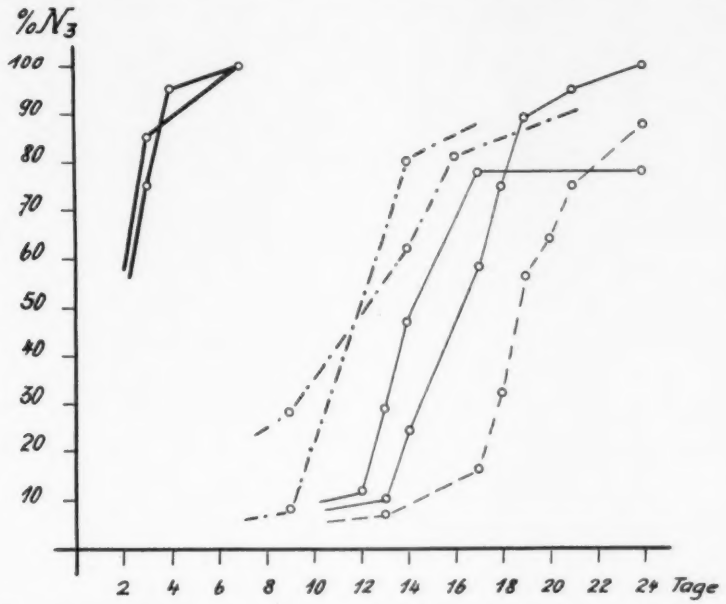


Abb. 45. Weiterentwicklung der Deutonymphe (N_2) zur Tritonymphe (N_3) in verschiedenen Zuchtmedien (Futterqualität). ——— Wasser bzw. Agarboden, — — — — Zuckerwasser, — · — · — · — Hefemangelfutter, ——— Hefemastfutter. Jede Kurve verbindet die erhaltenen Werte einer einzelnen Zuchtschale.

L.
5
54

zu dem betreffenden Experiment verwendet werden. Einwandfreie Versuchsbedingungen erhalte ich also nur dann, wenn ich gleichalterige, möglichst frisch geschlüpfte Individuen verwende. Um diese Forderung zu erfüllen, werden nur Deutonymphen gesammelt, die sich noch im Torpor befinden. Für die praktische Durchführung ganzer Versuchsserien reicht aber die Zahl der Torportiere häufig nicht aus. In diesen Fällen werden für die Experimente grosse Mengen Deutonymphen beliebigen Alters verwendet. Dabei sind nicht die gleichen Prozentzahlen von Tritonymphen zu erwarten, wie sie Torporindividuen liefern würden. Uns interessieren aber nicht die absoluten, sondern die relativen Werte, die Unterschiede zwischen Experiment und Kontrollversuch, welche bei grossen Zahlen ohne weiteres statistisch geprüft werden können.

Abb. 45 zeigt, dass erhöhte Feuchtigkeit sowohl der Luft als auch des Futterbodens keine Beschleunigung der Tritonymphenbildung bewirkt. Sowohl Deutonymphen, die auf sehr wasserreichem Agar, wie auch solche, die direkt in Wasser gehalten werden, ergeben frühestens nach einer Woche die ersten Tritonymphen, während die restlichen Deutonymphen sich erst im Laufe weiterer Wochen zum nächsten Stadium häuten.

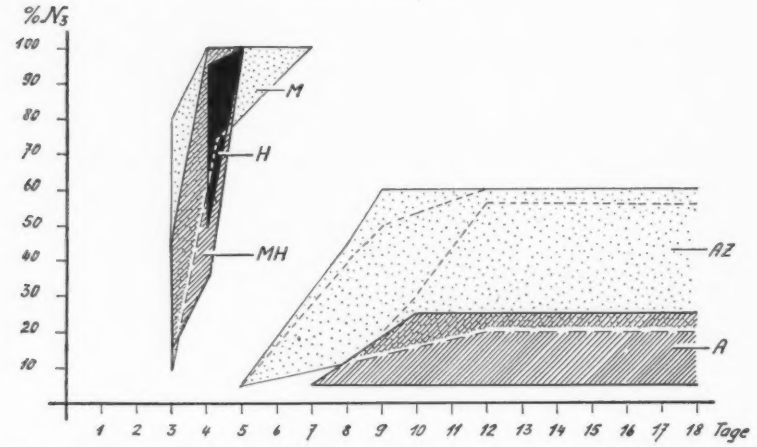


Abb. 46. Weiterentwicklung der Deutonymphe auf verschiedenen Zuchtmedien. A = Agar, AZ = Agar und Zucker, M = Mais, MH = Mais und Hefe, H = Hefeextrakt bzw. Frischhefe. Die Ergebnisse der einzelnen Klassen einer Versuchsserie sind als Flächen dargestellt (vgl. Text). Im Feld AZ sind die Ergebnisse für zwei sich intermediär verhaltende Zuchtschalen wie in Abb. 45 eingetragen.

VOL. 35 1954

2. Futterqualität.

Beim ersten Schritt wirken als „ungünstige" Lebensbedingungen Faktoren des sich verschlechternden Futters. Die Verabreichung eines qualitativ besseren Futters könnte vielleicht „günstige" Lebensbedingungen schaffen.

Abb. 45 zeigt das Ergebnis diesbezüglicher Versuche. Deutonymphen, die in Zuckerwasser gehalten werden, zeigen das gleiche Verhalten wie solche, die reinem Wasser ausgesetzt sind. Die kleine Verzögerung gegenüber den Kontrollen ist bedeutungslos, da in anderen Serien (z.B. Zuckeragar in der Versuchsserie der Abb. 46) umgekehrt leichte Beschleunigungen, die ebenfalls statistisch ohne Bedeutung sind, registriert werden können. Mangelfutter, d.h. Agar mit sehr wenig Hefe vermag ebenfalls keine wesentliche Beschleunigung der Tritonymphenbildung zu bewirken. Ganz anders verhält sich ein Mastfutter, das aus Agar und einem grossen Überschuss an Hefe bzw. Hefeextrakt besteht. Bereits drei Tage nach dem Einsetzen von Deutonymphen, die sich noch im Torpor befinden, häuten sich 75—85 % zu Tritonymphen, nach vier, fünf, spätestens nach sieben Tagen sind es 100 %! Wenn wir von diesen Zeiten die Dauer der Torporstadien abziehen, dann können wir sagen, dass die frisch geschlüpfte Deutonymphe bereits nach dem ersten Tag in den Torpor, der zur Tritonymphe überleitet, eintreten kann. Wichtiger ist aber die Tatsache, dass bereits nach wenigen Tagen sämtliche Individuen zur Weiterentwicklung veranlasst werden, während auf

den anderen Medien Wochen verstreichen können, bis die letzte Deutonymphe zur Häutung schreitet.

Während in Abb. 45 die Ergebnisse einzelner Schalen einer Versuchsserie aufgetragen sind, werden in Abb. 46 für eine andere Serie die Ergebnisse der einzelnen Klassen gesamthaft als Flächen dargestellt. Alle registrierten Punkte für Zuckeragar liegen innerhalb der mit AZ bezeichneten Fläche, d.h. also, in einer Schale waren nach 5 Tagen bereits 5 % Tritonymphen zu finden, nach 12 Tagen gab es kein Zuchtgefäss mehr, das unter 20 % Tritonymphen zeigte, aber selbst nach 18 Tagen gab es noch keine Schale, die mehr als 60 % aufwies. Zur Erläuterung sind in der Fläche AZ die Messpunkte zweier Schalen in gleicher Weise wie in Abb. 43 eingetragen. Abb. 46 zeigt nochmals, dass reiner Agar, sowie Zuckerfutter keinen Einfluss auf diesen zweiten Entwicklungsschritt ausüben. Ausserdem ist aber aus der Darstellung ersichtlich, dass gut gekochter Mais (mit Agar als Bindesubstanz) die gleiche Wirkung zeigt wie Hefemastfutter, also die Häutung sämtlicher Deutonymphen, die als Torporstadien in die Versuchsschalen eingesetzt worden sind, innert kürzester Zeit erzwingt. Dass Maisfutter, versehen mit Hefe oder Hefeextrakt, im selben Sinne wirksam ist, versteht sich von selbst.

3. Geruchliche Natur des Reizes.

Die Ergebnisse der eben erwähnten Versuche zeigen einwandfrei, dass die Qualität des Futters weitgehend über die Dauer des Deutonymphenstadiums entscheidet. Reichliches, gutes Futter, das die Ontogenese des Individuums und seiner Nachkommen sichern kann, führt zu einer sofortigen Weiterentwicklung der Deutonymphe. Auf einem Nährboden, der jene Sicherungen nicht versprechen kann, wird das widerstandsfähige Wanderstadium länger ausgedehnt, bis die Deutonymphe auf ein zusagenderes Futter getragen wird oder nach längerer Wartezeit die Häutung trotz ungünstiger Futterbedingungen durchgeführt wird.

Es stellen sich nun zwei Fragen:

1) Auf welche Weise kann eine Deutonymphe, die erwiesenermassen keine Nahrung aufzunehmen vermag, feststellen, dass reichliches und gutes Futter vorhanden ist?

2) Wirkt das Futter, z.B. die Hefe als Ganzes auf diesen Häutungsschritt auslösend oder gibt es relativ einfache Stoffkomponenten, welche die gleiche Wirkung ausüben?

Die erste Frage soll zuerst behandelt werden, da ihre Antwort für die Auswahl der wenigen, für die Untersuchung der zweiten Frage verwendeten Stoffe wichtig ist.

Das „gute" Futter kann nicht via Darm und Stoffwechsel auf den Körper

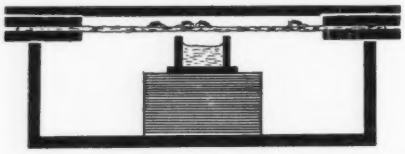


Abb. 47. Versuchsanordnung der Chemotaxis-Experimente. Schematische Darstellung. Die Milben sind durch eine Filtrierpapierschicht vom Geruchstoff getrennt.

einwirken. Eine Registrierung kann nur auf chemorezeptorischem Wege erfolgen, der die Häutung auslösende Reiz kann also geschmacklicher oder geruchlicher Natur sein. Als Geschmacksorgane könnten vor allem die rudimentären Genitaltaster (S. 103; 123; Abb. 34), eventuell auch die stets auf dem Boden schleifenden Gnathosomafäden in Betracht kommen. Als Geruchsorgane sind uns bereits die auf den Beinen I und II vorhandenen Riechkolben bekannt (S. 124). Da eine experimentelle Überprüfung des Einflusses der hypothetischen Geschmacksorgane auf die Tritonymphenbildung aus technischen Gründen nicht möglich ist, wurde nur die Bedeutung des Geruchssinnes für diesen Entwicklungsschritt untersucht.

a) *Chemotaxis-Versuche.*

Vorerst muss festgestellt werden, ob die Deutonymphen von *H. laboratorium* tatsächlich über einen Geruchssinn verfügen, wie das oben (S. 124) angenommen wurde. Chemotaxis-Versuche sollen die Antwort geben.

VOL. 35 1954

Y-Rohr-Versuche, bei denen das Ende des einen Schenkels mit Mastfutter, dasjenige des anderen Schenkels mit reinem Agar gefüllt wurde, haben nicht befriedigt. Erstens kann die Auszählung nicht einwandfrei durchgeführt werden und zweitens bildet sich an den Wänden des Glasrohres Kondenswasser, in welchem die Deutonymphen schwimmen, wodurch der Geruchssinn möglicherweise ausgeschaltet werden könnte. Dagegen hat sich folgende Versuchsanordnung bewährt (Abb. 47):

Ein Filtrierpapier, das in konzentrische Kreise von 1, 2, 3 und 4 cm Radius unterteilt ist, wird zwischen zwei Glasringe (durchbohrte Glasdeckel mit einem Öffnungsradius von 4 cm) geklemmt. Dieser für Gerüche durchlässige Deckel wird auf eine Standardschale von 13 cm Durchmesser gelegt, in welcher ein kleines, den Duftstoff enthaltendes ringförmiges Gefäss von ungefähr 1 cm Durchmesser so montiert ist, dass sein oberer Rand direkt unter das Zentrum des Filterpapiers zu liegen kommt, ohne dieses aber zu berühren. Die Milben werden auf das Filterpapier gesetzt und dieses durch einen dicht schliessenden, ganzen Glasdeckel überdeckt. Die ganze Versuchsanordnung muss während der Versuchsdauer im Dunkeln gehalten werden, um die starke positive Phototaxis auszuschalten. Vor dem Auszählen der einzelnen Kreisringe, die nur im Licht ausgeführt werden kann, werden alle Milben durch Äther getötet. Wird diese Versuchsanordnung für homoiomorphe Stadien verwendet, dann muss das Filtrierpapier leicht angefeuchtet und ein zu starkes Absinken der Luft-

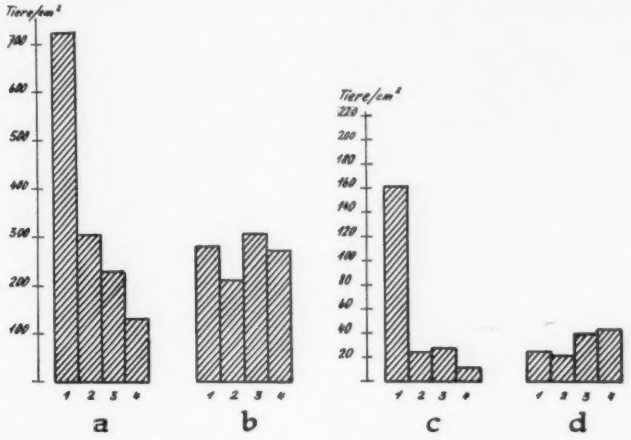


Abb. 48. Chemotaxis-Versuche mit Hefegeruch. a) Deutonymphen über feuchter Hefe, b) Deutonymphen; Kontrollen über Wasser, c) Homoiomorphe Stadien über feuchter Hefe, d) Homoiomorphe Stadien; Kontrollen über Wasser. *1* = Kreisfläche direkt über dem Duftstoff, *2—4* = anschliessende, konzentrische Ringflächen von 2, bzw. 3, bzw. 4 cm Aussenradius.

L.
5
54

feuchtigkeit durch einige Wassertropfen am Grunde der Schale verhindert werden.

Die Ergebnisse von Versuchen, in denen Hefe als Duftstoff verwendet wurde, sind in Abb. 48 dargestellt. Für die Kontrollen wurde Wasser eingefüllt. Sowohl die heteromorphen Deutonymphen als auch die homoiomorphen Stadien (hauptsächlich Adulti) zeigen deutlich positive Chemotaxis auf Hefeduft. Die Ansammlung über dem Duftstoff durch die anfänglich wahllos zerstreuten Deutonymphen ist nach 1/2 Stunden vollzogen. Die weniger mobilen Adulti benötigen dazu etwas mehr Zeit. Andere Duftstoffe ergaben weniger klare Befunde, doch ist das für unsere Versuche nicht von Belang, da uns vor allem das Verhalten gegenüber Hefe interessiert. Wichtig ist, dass ein Geruchssinn nachweisbar ist und dass dieser vor allem gegenüber dem Geruch der Hefe, eines für die Entwicklung unentbehrlichen Teiles der Nahrung, sehr ausgeprägt ist.

Angefeuchtete Hefe, Hefeextrakt und Trockenhefe duften — für das menschliche Geruchsorgan — intensiver als in trockenem Zustand und wirken auch im Chemotaxis-Versuch schneller und besser. Bei den Kontrollen mit Wasser kann es, besonders bei verminderter Luftfeuchtigkeit im Versuchsgefäss, ebenfalls zu einigen Ansammlungen im Zentrum kommen, doch erreichen diese nicht annähernd diejenige Dichte wie bei den Hefeversuchen und sind in der Regel auch an anderen Stellen des Filtrierpapieres zu finden.

b) *Exstirpations-Versuche.*

Das Ausschalten der Riechkolben soll auf zwei weitere Fragen Auskunft geben:

1) Sind die Riechkolben tatsächlich der Sitz des nachgewiesenen Geruchssinnes?

2) Wie reagieren Deutonymphen ohne Geruchsorgan auf Mastfutter? Oder mit anderen Worten: Kann die Häutung der Deutonymphe zur Tritonymphe tatsächlich durch geruchliche Reize ausgelöst werden?

Ein Überziehen der Riechkolben mit Lack kommt wegen der Kleinheit des Objektes und wegen der Unzuverlässigkeit der Methode nicht in Frage. Es bleibt somit nur die Exstirpation. Diese wurde auf verschiedenen Wegen versucht. Das Entfernen der Kolben mittels Thermokauter gelang nicht. Die feinsten erhältlichen Kauternadeln sind viel zu grob. Es wurden deshalb aus Platindraht, später aus entspiralisiertem Glühbirnendraht feinste Nadeln selbst hergestellt. Die besten Ergebnisse wurden mit Glühfaden erzielt, der zu einer feinen Spitze ausgezogen und an den Originalkauternadeln kurz geschlossen wurde. Mittels eines Widerstandes konnte der Heizstrom dosiert werden. Trotzdem gelingt auf diesem Wege die Zerstörung der Geruchsorgane nicht. Ist die Dosierung der Strommenge zu klein, dann tritt keine oder keine nachweisbare Schädigung der Riechkolben oder der ganzen Extremitäten ein. Wird die Dosis erhöht, die Wärmeproduktion gesteigert, so verbrennt wegen der Kleinheit der Milbe gleich das ganze Tier; eine Zwischeneinstellung gibt es nicht.

VOL. 35 1954

Die Exstirpation gelang dagegen durch direktes Amputieren der beiden ersten Beinpaare unmittelbar hinter den Kolben. Mit einiger Übung kann diese Operation an den narkotisierten Tieren, welche die betreffenden Beine parallel nach vorne strecken, unter der binokularen Lupe mit einer gewöhnlichen Rasierklinge ausgeführt werden. Leider überleben die operierten Tiere, selbst bei sterilem Arbeiten, diesen Eingriff nicht. Nach 1 bis 2 Stunden, spätestens nach einem Tage sterben alle Individuen. Offenbar ist die verursachte Wunde für die Milben, welche keine Regeneration zeigen, zu gross. Es wurde auch versucht, die entsprechenden Extremitätenabschnitte schon bei der Protonymphe zu amputieren, so dass nach der Häutung Deutonymphen mit dem gleichen Effekt entstehen sollten, wie das nach VITZTHUM (1940/43) bei einigen Milben beobachtet worden war. Die Operation ist aber auf diesem Stadium noch schwieriger auszuführen und, wenn sie gelingt, überleben die Protonymphen, wie übrigens auch die Adulti, den Eingriff nicht.

Die beiden obigen Fragen können also durch Exstirpationsversuche nicht beantwortet werden. Dass die Riechkolben ihren Namen zu Recht tragen, darf aber aus den auf S. 124 dargelegten Gründen als sicher angenommen werden (Homologien). Die andere Frage, die von der Beantwortung der ersten unabhängig ist, kann in ihrer zweiten Fassung auf folgende Weise gelöst werden.

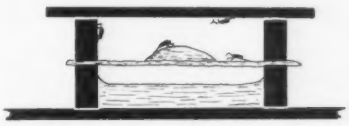


Abb. 49. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung der „Doppelring"-Experimente. Im unteren Ring befindet sich der Duftstoff (Hefemastfutter), im oberen, durch ein Filtrierpapier von jenem getrennt, die Deutonymphen. Der kleine Agartropfen bietet den sich entwickelnden Tritonymphen die notwendige Feuchtigkeitsinsel.

c) *Doppelring-Versuche.*

Es muss versucht werden, die Deutonymphen dem Futterduft auszusetzen, ohne sie zugleich in direkten Kontakt mit dem Futter treten zu lassen. Am zweckmässigsten wird das durch die in Abb. 49 veranschaulichte Versuchsanordnung erreicht, welche eine Abwandlung derjenigen für die Chemotaxis-Versuche darstellt. Der untere Glasring (Durchmesser 2 cm) wird zur Hälfte mit Hefemastfutter bzw. reinem Agar (Kontrollen) gefüllt. Der zweite, obere Ring ist für die Milben bestimmt und besitzt einen dicht schliessenden, für Gase aber durchlässigen Boden aus Filtrierpapier, auf dem ein kleiner, nicht die ganze Fläche bedeckender Agartropfen liegt. Dieser ist notwendig, um den sich entwickelnden Tritonymphen einen feuchten Untergrund zu verschaffen, da sie ohne diesen nach der Häutung zugrunde gehen und ihre Exuvien auf dem Papier kaum mehr zu entdecken sind. Der obere Ring wird mit einem Glasdeckel verschlossen und mit Vaseline auf den unteren geklebt.

Tab. 8 zeigt die Versuchsergebnisse zweier Serien. Zwei verschiedene Kontrollen sind notwendig: Kontrolle B, welche im untern Ring nur Agar enthält und Kontrolle A, bei welcher die Deutonymphen direkt auf das Mastfutter gesetzt werden (also kein Doppelring), um zu prüfen, ob das für die betreffende Versuchsserie verwendete Futter eine genügend grosse Hefekonzentration aufweist. Diese ist bei verschiedenen Serien nie völlig identisch, weshalb deren Ergebnisse nicht zusammengefasst, sondern nur diejenigen einzelner Serien in die Tabelle aufgenommen werden dürfen. Die eine Serie der Tab. 7 wurde nach 2 Tagen, die andere erst nach 3 Tagen ausgezählt.

Tab. 8. *Ergebnisse der Doppelring-Versuche. In der Kontrolle B wurde im unteren Ring als „Duftstoff" Agar verwendet.*

		nach 2 Tagen		nach 3 Tagen	
		Gesamtzahl	% N_2	Gesamtzahl	% N_2
Kontrolle A	N_2 direkt auf	829	82,1	461	94,5
	Mastfutter	—	—	532	94,3
Kontrolle B	N_2 auf Agar	636	15,1	653	22,9
	über Agar	914	21,9	963	33,4
Experiment E	N_2 auf Agar	1 014	76,3	683	96,0
	über Hefe	714	84,4	823	91,1

Die Unterschiede zwischen B und E können mit dem t-Test gut gesichert werden, während sich zwischen A und E kein Unterschied ergibt. Damit ist nachgewiesen, dass schon allein durch Hefegeruch die Häutung der Deutonymphe zur Tritonymphe ausgelöst werden kann.

4. Weitere Analyse der auslösenden Stoffe.

Nachdem nun feststeht, dass tatsächlich die Hefe (und offenbar auch der Mais) durch den Geruch die Häutung der Deutonymphe zur Tritonymphe auszulösen vermag, wäre es von Interesse, festzustellen, welche Bestandteile der Hefe diesen Vorgang hauptsächlich bewirken. Folgerichtig kommen in erster Linie solche stoffliche Komponenten in Frage, welche den Geruch der Hefe bedingen. Bevor aber auf diesbezügliche Versuche eingegangen werden soll, möchte ich noch eine andere Feststellung erwähnen.

a) *Der* pH-*Wert des Futters.*

Der erste Schritt, der von der Protonymphe zur Deutonymphe führt, kann durch saures Futter weitgehend erzwungen werden (S. 134). Für die Weiterentwicklung der Deutonymphe ist dagegen der pH-Wert des Futters ohne jede Bedeutung. Ausser durch direkte pH-Experimente wird das auch durch folgendes Verhalten demonstriert: Werden Deutonymphen auf Mastfutter mit dem pH-Wert von 3,3 — dem tiefsten pH-Wert, den die homoiomorphen Stadien ertragen — verbracht, so tritt sofort der bekannte Häutungsschub ein, trotzdem es gerade dieses Futter ist, welches fast 100 % der Individuen zur Ausbildung der Deutonymphe veranlassen würde.

b) *Vitamin-Versuche.*

Zufällig wurde festgestellt, dass für den Menschen der Geruch alter Zuchten mit Hefefutter mit demjenigen von Vitamin B_1 identisch oder diesem doch sehr ähnlich ist. Die Hefe ist nun tatsächlich sehr reich an den Vitaminen B_1 und B_2. Diese Wirkstoffe sind für die Entwicklung der Insekten unentbehrlich, wie z.B. Fröbrich (1939) und Offhaus (1939) an Käfern zeigen konnten. Entsprechende Untersuchungen wurden an *H. laboratorium* nicht durchgeführt, doch gibt die Tatsache, dass bei ungenügender Hefeernährung die Entwicklung verlangsamt und gestoppt wird, wobei das Tier trotzdem weitervegetieren kann, einen Hinweis dafür, dass auch bei dieser Milbe ähnliche Verhältnisse vorliegen. Die Vermutung liegt daher auf der Hand, die Deutonymphen könnten im speziellen die Vitaminkonzentration geruchlich perzipieren.

Die Nährböden für die Versuche werden ausschliesslich mit vitaminfreiem Davis-Agar zubereitet. Die Vitamine werden dem erkaltenden Agar beigegeben, so dass das hitzeempfindliche Vitamin B_1 nicht geschädigt wird. Zur An-

VOL. 35 1954

Tab. 9. *Einfluss von Vitaminen auf die Weiterentwicklung der Deutonymphe zur Tritonymphe* (N_3).

			Gesamtzahl	% N_3	t-Test
A	Agar	nach 1 Tag	656 310	4,0 12,2	P: 0,02—0,01
B	B_1-Tabletten . .		296 240	51,4 58,0	schwach gesichert
C	B_1-Tabletten . .	nach 2 Tagen	302 253	92,6 77,5	P: 0,05—0,02
D	B_1-Ampullen . .		425 260	12,9 29,2	schwach gesichert
E	Agar	nach 2 Tagen	112 125	17,9 19,2	E/F: P: 0,05—0,02 schwach gesichert
F	B_2-Ampullen einfache Dosis		107 80	33,7 28,8	E/G: $P \approx 0{,}05$ schwach gesichert
G	B_2-Ampullen doppelte Dosis		149 119	65,2 47,1	H/F: $P: < 0{,}01$ gesicherter Unterschied
H	Mastfutter . .		118 116	95,8 89,7	H/G: $P: > 0{,}05$ kein Unterschied

wendung kamen die Vitaminpräparate Bénerva forte (Tabletten) und fortissimum (Ampullen) für die B_1-Versuche und Beflavin für die B_2-Versuche (Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. Basel).

In Tab. 9 sind die Ergebnisse von drei Versuchsserien zusammengestellt. Bereits die Aneurin-Versuche (B_1) zeigen überraschende Ergebnisse. Werden Bénerva-Tabletten dem Futter beigegeben, dann zeitigen die Versuche ein positives Ergebnis, wird das Vitamin aber in reiner Form aus Ampullen beigemischt, so verlaufen die Versuche negativ, d.h. die Deutonymphen verhalten sich auf dem Medium wie auf reinem Agar. Dagegen führt reines Lactoflavin (B_2) zu vermehrten Häutungen der Deutonymphen. Es ist das die zweite Überraschung, denn Lactoflavin zeigt, wenigstens für das menschliche Geruchsorgan einen weniger intensiven Geruch als Aneurin. Dass die registrierten Unterschiede gegenüber den Agarkontrollen bei der doppelten B_2-Dosis weniger gesichert sind als bei der einfachen Dosis liegt an der in dieser Serie aufgetretenen grösseren Streuung der Klasse G.

Auch bei den B_2-Experimenten wurden ausser den Kontrollzuchten auf Agar auch solche auf Mastfutter gehalten. Bei den Ergebnissen ergibt sich zwischen diesen letzteren und den konzentrierten B_2-Schalen (Klasse G) kein

statistisch gesicherter Unterschied, d.h. sie dürfen als identisch angesehen werden. Der Unterschied zwischen den Klassen H und F dagegen ist gesichert, d.h. die geringere Konzentration von Vitamin B_2 hat wohl eine gegenüber den Agarkontrollen gesicherte Steigerung der Tritonymphenbildung veranlasst, doch nicht in dem ausgeprägten Masse, wie das durch Hefemastfutter geschieht.

Die Resultate dieser Versuche ergeben somit folgendes: Das stärker riechende Vitamin B_1 hat in reiner Form keine Wirkung, das schwächer riechende Vitamin B_2 erzielt dagegen eine deutliche Beschleunigung der Tritonymphenbildung. Das spricht nicht gegen die bereits bewiesene geruchliche Natur des auslösenden Reizes, da wir ja nicht wissen können, welche Stoffe durch die Riechkolben perzipiert werden und wie die Schwellenwerte bei den Milben liegen. Die stark positive Wirkung der Bénerva-Tabletten beruht nicht auf dem Aneurin, sondern auf irgend einer Komponente der beigemischten Hüllsubstanzen. Diese Frage wurde systematisch nicht mehr weiter analysiert.

c) *Stärke.*

Als Hüll- und Bindesubstanz für Tabletten kommt unter anderem Stärke in Frage. Da auch Mais, der ja sehr viel Stärke enthält, ebenfalls eine stark positive Wirkung erzielt (S. 145), wurde der Einfluss von Pflanzenstärke auf die Tritonymphenbildung untersucht. Eine fördernde Wirkung auf diesen Entwicklungsschritt wurde nicht festgestellt.

C. DISKUSSION.

In der Literatur sind einige wenige Angaben zu finden, die sich ebenfalls mit der Frage befassen, ob der Prozentsatz der in einer Population sich entwickelnden Hypopoden durch exogene Faktoren beeinflusst werden kann. In diesem letzten Abschnitt sollen unsere Ergebnisse mit den erwähnten Angaben verglichen werden.

Vitzthum (1940/43) schreibt in seinem umfangreichen Werk über die *Acari:* „Nur bei den *Anoetidae* scheint es obligatorisch zu sein, dass jedes Individuum das Stadium der Deutonymphe durchmacht". Unsere Befunde haben gezeigt, dass mindestens für einen Vertreter der *Anoetinae,* für *H. laboratorium* dies nicht zutrifft.

Mégnin (1873, 1874 u.a.) stellt bei der auf Pilzen lebenden *Histiostoma feroniarum* Duf. (= *H. rostro-serratus* Berlese = *Tyroglyphus rostro-serratus* Mégnin) fest, dass die relative Häufigkeit von *Hypopus feroniarum,* also der heteromorphen Deutonymphe sehr variabel ist. Auf feuchtem Pilzfutter findet er Tausende von *Histiostoma*-Formen, auf austrocknendem Futter verschwinden die meisten und werden durch Unmengen der kleinen

VOL. 35 1954

Hypopoden ersetzt. Beigabe frischer, feuchter Pilze führt zur sofortigen Verwandlung der Hypopoden. Bei *Caloglyphus mycophagus* war diese Umwandlung bereits nach 24—40 Stunden vollzogen. MÉGNIN nimmt Feuchtigkeitsunterschiede als Ursache des vermehrten Auftretens bzw. der Weiterentwicklung der Hypopoden an. Bei ungünstigen Lebensbedingungen kann das Individuum willkürlich das widerstandsfähige Wanderstadium ausbilden, bei Wiederherstellen besserer Verhältnisse tritt der Übergang zu einer „normalen" Nymphe ein.

REUTER (1909) vertritt demgegenüber energisch die Auffassung, dass die Deutonymphenbildung keineswegs durch Aussenfaktoren beeinflusst werde. Er stützt sich dabei auf die Beobachtung verschiedener Autoren, wonach Hypopoden selbst unter den günstigsten Bedingungen auftreten. Vor allem MICHAEL (1884) behauptet, dass das vermehrte Auftreten der Hypopoden beim Austrocknen lediglich auf der erhöhten Mortalität der gegen Trockenheit nicht geschützten übrigen Stadien beruhe. Bei seinen Versuchen, die er ohne Pilzfutter durchführte, beobachtete er nach erneuter Befeuchtung, dass sich aus den Eiern und den Hypopoden in vermehrtem Masse wieder Tyroglyphiden entwickeln, so dass der Anteil der Hypopoden an der Population relativ wieder zurück geht. Er beschreibt sogar, dass er unter äussert guten Bedingungen an verschiedenen Fundstätten nebst vielen Milben und anderen Tieren Hypopoden in riesiger Zahl fand. Bei anderen seiner Versuche ergaben sich unter günstigen Feuchtigkeitsbedingungen mehr Deutonymphen als in austrocknenden Zuchten.

Erst 1924 hat dann HANNA SCHULZE wiederum festgestellt, dass doch Aussenfaktoren in die Ontogenese eingreifen können. Erhöhung der Luftfeuchtigkeit bis zur Sättigung erzwingt bei der Mehlmilbe *Tyroglyphus farinae* die Umwandlung des Hypopus zur Tritonymphe innert ein bis zwei Tagen. Bei *Caloglyphus mycophagus* kann Futtermangel fast bei allen Individuen die Ausbildung der Deutonymphe veranlassen, während wiederum die Feuchtigkeit die Umwandlung der Deutonymphe zur Tritonymphe beschleunigt, wobei der die Umwandlung veranlassende Feuchtigkeitsgrad individuell verschieden sein soll.

Beim Vergleichen von Ergebnissen, die an verschiedenen Milben erhoben wurden, darf nicht vergessen werden, dass selbst nächst verwandte Arten grosse Unterschiede in Lebensweise und Entwicklung zeigen können. Die auf die Ontogenese wirkenden Aussenfaktoren, sowie der Umfang ihres Einflusses brauchen darum bei verschiedenen Formen nicht identisch zu sein. Bei *H. laboratorium* führt eine Verschlechterung des Futters zu einer relativen und absoluten Vermehrung der Deutonymphen. Feuchtigkeitsunterschiede sind dagegen ohne jeden Einfluss. Es besteht aber keine Ursache, die von H. SCHULZE festgestellte, positive Reaktion der Mehlmilben auf veränderte Luftfeuchtigkeit als nicht den Tatsachen entsprechend zu betrachten, lebt doch diese Milbenart unter gänzlich anderen ökologischen Bedingungen, auf die eben ihre Reaktionsnormen abgestimmt sein müssen. Anders verhält es sich bei den von MÉGNIN und MICHAEL untersuchten Formen. Ihre Befunde, vor allem an der mit *H. laboratorium* sehr nahe verwandten und sehr ähnliche Lebensweise zeigenden *H. feroniarum*, stimmen mit den unserigen überein. Ein Einfluss des Austrocknens auf den ersten Schritt besteht bei ihren Untersuchungsobjekten, wie Michael zeigte, sicher nicht. Die nach Zugabe von frischen Pilzen beobachtete Verwandlung der Hypopoden ist nicht auf eine damit verbundene

Erhöhung der Luftfeuchtigkeit zurückzuführen, sondern auf das Wiederherstellen optimaler Ernährungsbedingungen. Sicher eine falsche Deutung hat dagegen MICHAEL seinen Beobachtungen über das Auftreten von Hypopoden in riesiger Zahl unter optimalen Bedingungen gegeben. Bei unseren Experimenten haben wir gesehen, wie schwierig es ist, nur den zu untersuchenden Faktor zu variieren und alle übrigen auszuschalten oder konstant zu halten. Abgesehen davon, dass es sehr problematisch ist, zu bestimmen, welche Umweltsbedingungen für eine bestimmte Milbe günstig oder gar optimal sind, kann bei Freiland-Beobachtungen, wie sie MICHAEL durchgeführt hat, ohne genaue analytische Untersuchungen gar nicht behauptet werden, dass wirklich alle wesentlichen Faktoren im Optimum vorliegen. Ein einziger wirksamer Faktor kann nach dem Gesetz des Minimums ein Medium für die Milbe ungünstig machen. In einer frischen Stammzucht können bis gegen 100 % Deutonymphen von *H. laboratorium* auftreten, nur weil das Futter infolge der bei der Gärung entstehenden Essigsäure immer saurer wird, so dass die Milben, trotz Vorhandenseins grosser Mengen hochwertigen Futters, auf diesem Medium nicht mehr leben können. Aber selbst, wenn es sich tatsächlich in allen Beziehungen um optimale Zustände handelt, darf das massenhafte Auftreten von Deutonymphen keineswegs im Sinne MICHAELS und REUTERS gedeutet werden, denn es ist klar, dass sich die mobilen Deutonymphen gerade dort versammeln, wo sie die guten Lebensbedigungen finden. Ebenso sicher ist, dass auf grossen Fundstätten, wie die von MICHAEL untersuchten Scheunen und Miststöcke darstellen, die Mikrobedigungen an den einzelnen Stellen niemals identisch sondern höchst unterschiedlich sind. Bereits in den Stammzuchten von *H. laboratorium* kann immer wieder beobachtet werden, wie sich das Futter infolge unterschiedlicher Bakterieninfektion inhomogen verändern kann. An den einen Stellen verschlechtert sich oft das Futter schneller; dort können sich fast alle Protonymphen zu Deutonymphen umwandeln, wie während des Torpors festgestellt werden kann. Andere Stellen bewahren ihre gute Qualität längere Zeit; dort sammeln sich die Deutonymphen an, wie die zurückgelassenen Exuvien deutlich zeigen!

Sichere Schlüsse lassen sich daher nur auf Grund genauer Experimente ziehen. Für *H. laboratorium* ergibt sich dabei folgendes Bild: Die Faktoren zur Auslösung des ersten Schrittes (Protonymphe zu Deutonymphe) wirken offenbar via Darm und somit via Stoffwechsel. Eindeutig nachgewiesen werden konnte der Einfluss der Wasserstoff-Ionen-Konzentration. Eine positive Wirkung hoher Zuckerkonzentrationen, d.h. starke Hypertonie des Mediums konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen besitzt sicher altes, verbrauchtes Futter eine Deutonymphen-auslösende Wirkung. Es gelang aber nicht, die Ursachen zu präzisieren. Weder Futtermangel noch Fäulnis- und Verwesungsstoffe

VOL. 35 1954

ergaben eine deutliche, statistisch gesicherte Vermehrung der Deutonymphen. Dieses negative Ergebnis der Analyse, in welcher die Faktoren einzeln untersucht wurden, sowie die unumstössliche Beobachtungstatsache, dass alte, verfaulte Zuchten die Deutonymphenbildung fördern, zwingen uns zur Annahme, dass die erwähnten Faktoren nicht einzeln, sondern nur in Kombinationen wirksam sind. So deuten z.B. die folgenden zwei Beobachtungen darauf hin, dass Futtermangel innerhalb enger Grenzen doch eine Rolle spielen könnte: Zuchten mit einem hohen Prozentsatz an Deutonymphen zeigen manchmal eine leichte Verzögerung der Entwicklung; Faulhefezuchten mit zusätzliche Frischhefe ergeben etwas weniger Deutonymphen als solche, welche nur verfaulte Hefe enthalten. Andere Beobachtungen lassen vermuten, dass die Milben selbst z.B. im Speichel Stoffe absondern könnten, welche das Futter im postulierten Sinne verändern würden, eine Hypothese, die experimentell schwierig zu überprüfen ist. Es muss die Aufgabe weiterer Untersuchungen sein, die Wirkung von Faktorenkombinationen abzuklären.

Als „günstige" Umweltsbedingung, welche den zweiten Schritt (Deutonymphe zu Tritonymphe) auszulösen vermag, müssen wir das Vorhandensein von hochqualitativem Futter in grossen Mengen (Hefemastfutter) ansprechen. Die auslösenden Reize wirken via Geruchsorgan auf die Deutonymphe. Die weitere Analyse ergab eine fördernde Wirkung des Wachstumsvitamins B_2 (Lactoflavin), während B_1 in reiner Form wirkungslos, in Verbindung mit unbestimmten Hüllsubstanzen (Bénerva-Tabletten) aber wie Hefemastfutter wirkt. Feuchtigkeitserhöhung ist ohne Einfluss.

Von besonders grossem Interesse ist hier die Tatsache, dass durch geruchliche Fernwirkung ein entwicklungsphysiologischer Vorgang ausgelöst werden kann. Es ist denkbar, dass die von den Riechkolben ins Zentralnervensystem geleiteten Erregungen die Ausschüttung von Häutungshormonen bewirken.

Noch einmal müssen wir auf MICHAEL zurückkommen. Seine Beobachtung, dass selbst unter optimalen Bedingungen Hypopoden auftreten, auf Grund derer er einen exogenen Einfluss auf die Deutonymphenbildung verneint, ist richtig. Selbst auf reiner, frischer Hefe durchlaufen bei *H. laboratorium* einzelne Individuen das Wandernymphenstadium. Auch H. SCHULZE (1924b) fand, dass bei *Caloglyphus mycophagus* plötzlich während zweier Monate auch unter den günstigsten Zuchtbedingungen Deutonymphen auftraten. Schon die Tatsache, dass bei *H. laboratorium* und bei anderen Milben immer Deutonymphen zu finden sind, dass lediglich der Prozentsatz unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich ist, zeigt, dass nicht nur Aussen-

faktoren für die Ausbildung der Deutonymphe verantwortlich sind, sondern dass auch innere, genetische Faktoren mitspielen. Nicht nur die einzelnen Spezies sind durch unterschiedlichen Grad in der Ausbildung der Deutonymphen charakterisiert (S. 130), auch die Individuen einer einzelnen Art zeigen alle Übergänge. Ob eine Art durch sehr häufiges Vorkommen der Deutonymphe oder durch nur sporadisches Auftreten des Hypopus charakterisiert ist, hängt von dem durchschnittlichen Verhalten der Einzeltiere ab, ist aber für das Individuum nicht verbindlich. Die Individuen sind in ihrer genetischen Konstitution — wir meinen damit hauptsächlich die Erbfaktoren, welche die Ontogenese bestimmen — nicht einheitlich. Das manifestiert sich auch in der grossen Variabilität der Entwicklungszeiten (S. 116). Wie diese genetische Verschiedenheit im einzelnen beschaffen ist, entzieht sich unseren Kenntnissen. Wahrscheinlich gibt es als Extreme Individuen, die ihrem Genotyp gemäss das Deutonymphenstadium durchlaufen müssen, und andere, welche die Fähigkeit der Deutonymphenbildung verloren haben. Beispiele dafür bieten jene Arten, die ausnahmslos den einen oder andern Zustand repräsentieren (S. 131). Allgemeiner könnte man auch sagen, dass der Schwellenwert für die exogenen Faktoren bei den einzelnen Individuen verschieden hoch liege, so dass bei den einen Individuen immer eine positive Reaktion einträte, bei anderen die Schwelle überhaupt nie erreicht würde.

Die Folgerung, dass auch innere Faktoren bei der Ausbildung der Deutonymphe eine Rolle spielen, hat sich uns schon zu Beginn unserer Untersuchungen aufgedrängt und hat dann ihre Bestätigung und Unterstützung in den Publikationen von Hanna Schulze gefunden.

H. Schulze unterscheidet bei *Caloglyphus mycophagus* Hypopoden aus innerer Anlage (Typus A) und solche, die durch äussere Einflüsse „erzwungen" werden (Typus B). Die Individuen lassen ihre Zugehörigkeit zu einem der beiden Typen schon auf dem Protonymphenstadium erkennen. Die Protonymphen, welche „freiwillige" Hypopoden liefern werden (A), sind von breitem Körperbau, diejenigen des Typus B weisen eine schmale, nach cranial verjüngte Form auf. Die ersteren benötigen für den Torpor 2—3 Tage, die letzteren dagegen 1—3 Wochen. Die Gestaltsmodifikation der Adulti (S. 134), die bei *H. laboratorium* nach Säureversuchen beobachtet wurde, stellt kein entsprechendes Phänomen bei unserem Untersuchungsobjekt dar; auch wurden keine unterschiedlichen Torporzeiten festgestellt.

Es ist auch denkbar, dass ein Teil der inneren Faktoren, welche zur Bildung von „Spontan-Deutonymphen" führen, nicht genetischer sondern physiologischer Natur ist. Es liegen aber nur einzelne, vage, hierauf bezügliche Beobachtungen vor, weshalb die Frage des inneren Milieus hier nicht weiter diskutiert werden soll.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die

VOL.
35
1954

Bildung und Weiterentwicklung der Deutonymphe weitgehend durch die Umwelt gesteuert werden kann, dass aber bei der Bildung des Hypopus auch innere Faktoren genetischer, eventuell auch physiologischer Natur von Bedeutung sind.

VII. DIE BEDEUTUNG DER VENTRALORGANE.

A. DES VERHALTEN GEGENÜBER SILBERNITRAT.

Wie schon bei der Besprechung der Morphologie erwähnt worden ist, besitzen die Milben der Unterfamilie der *Anoetinae* zwei Paar ring- bis schuhsohlenförmige Chitinstrukturen (S. 80; Abb. 3 a, 4 a). Sie wurden bisher in der Literatur zuerst als Saugnäpfe, später als Organe unbekannter Funktion bezeichnet (VITZTHUM 1929). Zudem werden sie als diagnostisches Merkmal verwendet.

Es hat sich im Laufe der Untersuchungen gezeigt, dass die Grösse, die Form und zum Teil auch die Lage dieser Chitinstrukturen stark variabel sind. Besonders auffällig wurden diese Variationen, als in einer wässerigen Zucht Milben mit extrem grossen und sehr schwach gelblich gefärbten Ventralorganen auftraten (Abb. 50). Leider wurden solche Extremfälle nachher nicht mehr gefunden und konnten auch experimentell nicht in diesem Ausmass erzeugt werden. Immerhin haben sie den Anstoss zu den folgenden Untersuchungen gegeben.

Bei genauer mikroskopischer Untersuchung der erwähnten Riesenformen am lebenden Tier konnte innerhalb des Walles eine äusserst feine Struktur der Cuticula nachgewiesen werden (Abb. 51), die der übrigen Körperoberfläche fehlt. Dieser Befund und die erwähnten Variationen legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den Ventralringen nicht einfach um bedeutungslose Oberflächenstrukturen handeln könnte.

Beim Baden der Milben in verdünnter Silbernitratlösung werden die Ventralorgane braun bis schwarz gefärbt. Bei längerer Einwirkung werden allmählich auch die darunter liegenden Eingeweide diffus bräunlich getönt, wobei eine langsame Ausbreitung dieser Färbung nach allen Richtungen beobachtete werden kann. Zugleich kann auch eine solche Bräunung im Bereiche der beiden grossen Körperöffnungen, Tokostom („Vulva") und After, auftreten, ausserdem werden auch die Kotballen im Colon und Rectum gefärbt. Bleiben die Milben 24 Stunden oder länger in der Silbernitratlösung, so wird in der Regel schliesslich das ganze Innere unregelmässig bräunlich gefärbt, während das Ventralorgan völlig schwarz, die übrige Cuticula aber ungefärbt erscheint. Lediglich an der Körperoberfläche haftende Verun-

Abb. 50. Weibchen mit extrem grossen Ventralorganen.

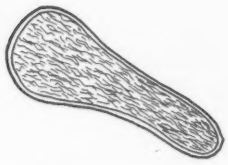


Abb. 51. Feinstruktur eines caudalen Ventralorganes eines Weibchens.

reinigungen können auch gebräunt werden und so eine stellenweise Färbung der Cuticula vortäuschen.

Um eine schnelle Färbung der Ventralorgane zu erreichen, werden Lösungen bis 10 % $AgNO_3$ verwendet. Aber auch stark verdünnte Lösungen (bis 0,01 %) führen zu Bräunungen, selbst wenn die Behandlung nur zwei bis fünf Minuten währt oder nur in einem kurz dauernden Eintauchen besteht, d.h. noch vor dem Sichtbarwerden der ersten Färbung abgebrochen wird. Alle mit $AgNO_3$ behandelten Milben sterben nach kurzer Zeit, spätestens nach einigen Stunden.

Bemerkenswert ist, dass im Uterus von behandelten Weibchen befindliche Embryonen, die noch von der derben Eischale umgeben sind, auch nach Tagen keine Bräunung aufweisen und ihre volle Entwicklungsfähigkeit beibehalten. Das zeigen z.B. Embryonen, die vor dem Tode der Mutter nicht mehr abgelegt werden konnten. Sie bleiben im zerfallenden Mutterleib zurück, sprengen die Eischale und kriechen als Larven innerhalb der resistenten mütterlichen Cuticula herum, bis schliesslich auch diese zerfällt und sie auf diese Weise aus ihrem Gefängnis ins Freie gelangen. Auch schlüpfreife Embryonen, die aus toten Weibchen herauspräpariert werden, zeigen keine Schädigung durch das Silbernitrat.

Aus den angeführten Beobachtungen darf vorerst geschlossen werden, dass Ionen des $AgNO_3$ in den Milbenkörper eindringen und dass dieses Eindringen bei den Ventralorganen besonders leicht vor sich geht, während die übrige Cuticula undurchlässig ist.

Es stellen sich nun zwei Fragen: 1. Welche Funktion erfüllen die Ventralorgane und 2. Auf welchen Vorgängen beruht die Schwärzung der Ventralorgane?

VOL. 35 1954

B. DIE VENTRALRINGE ALS ORGANE DER OSMOREGULATION.

1. Fälle von extrarenaler Osmoregulation.

GLOOR und CHEN (1950) fanden bei Drosophilalarven ein „Analorgan", das mit verdünnten Silbernitratlösungen färberisch zur Darstellung gebracht werden kann. Die unter den plattenförmigen Cuticulafeldern befindliche Hypodermis zeigt besondere, stark vergrösserte Zellen. Da ein bestimmter Prozentsatz der Larven die Behandlung mit $AgNO_3$ überlebte, konnte an diesen Tieren nachgewiesen werden, dass es sich bei den Analorganen um Osmoregulatoren handelt. Larven mit imprägnierten Analorganen wurden verschiedenen Salzkonzentrationen ausgesetzt und nach einer gewissen Zeit der Chloridgehalt ihrer Haemolymphe bestimmt. Dabei zeigte es sich, dass die bei den unbehandelten Kontrolltieren in bestimmtem Bereiche vorhandene Regulation nicht mehr spielte. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Analorgane befähigt sind, aus dem umgebenden wässerigen Medium Ionen aufzunehmen. WHEELER (1947) fand nach Verfütterung von radioaktivem Jod eine besonders starke Jodanreicherung in den Hypodermiszellen des von GLOOR und CHEN untersuchten Analorganes.

Ausserdem ist bekannt, dass die wasserlebenden Larven vieler Insekten Analpapillen oder „Analkiemen" besitzen, welche ebenfalls für die Osmoregulation von Bedeutung sind. KOCH konnte 1938 zeigen, dass die Analpapillen aus schwach konzentrierten Lösungen Chloride absorbieren. WIGGLESWORTH (cit. MARTINI 1923) beobachtete bei Aedes- und Chironomuslarven eine Vergrösserung der Analpapillen in destilliertem Wasser, eine Verkleinerung in Leitungswasser, welche in 0,45 % Kochsalzlösung noch verstärkt wurde. Nach KROGH (1939) funktionieren die Analpapillen auf folgende Weise: Die Malpighischen Gefässe sondern einen hochkonzentrierten Urin ab. Die dabei freigesetzten Ionen werden durch die Analpapillen sofort wieder resorbiert. Die übrige Körperoberfläche vermag im wesentlichen nur Wasser aufzunehmen. So erklärt es sich, dass die Analpapillen im Süsswasser kräftig, im Brackwasser schwach ausgebildet werden.

Selbst bei Fischen wurden extrarenale Organe für die Osmoregulation festgestellt. So gilt z.B. heute als erwiesen, dass die Kiemen von *Anguilla vulgaris* Chloride ausscheiden (SMITH 1930, KEYS 1933). KROGH (1937) konnte dann zeigen, dass auch umgekehrt Süsswasserfische aus verdünnten Salzlösungen Chlorionen absorbieren können. GETMAN (1950) und COPELAND (1948, 1950) untersuchten die chloridausscheidenden extrarenalen Regionen histologisch. Sie stellten bei *Anguilla rostrata* und dem ebenfalls euryhyalinen *Fundulus heteroclitus* besondere „Chloridzellen" fest und untersuchten deren Veränderungen bei Fischen, die an verschiedene Salzkonzentrationen adaptiert waren. Im Normalfalle besteht die Funktion dieser Zellen in der Ausscheidung über-

schüssiger Ionen, doch glaubt COPELAND (1948) auf Grund vorläufiger Befunde, dass sie auch zur Ionenaufnahme befähigt sind.

2. Untersuchungen an *H. laboratorium*.

Die Vermutung lag nahe, es könnte sich bei den Ventralringen von *H. laboratorium* um analoge Organe handeln. Die Prüfung dieser Vermutung stösst aber auf Schwierigkeiten. Histologisch konnten keine Besonderheiten festgestellt werden. Da es aber nicht gelang, in allen Teilen einwandfreie Schnittpräparate herzustellen, darf aus diesem negativen Befund nicht auf das Fehlen besonderer Differenzierungen der Hypodermis geschlossen werden. Eine direkte, experimentelle Untersuchung, wie sie GLOOR und CHEN auf dem Wege der chemischen Exstirpation der Analorgane bei *Drosophila* ausführten, scheitert in erster Linie an der Letalität der mit Silbernitrat behandelten Milben. Zudem bietet die Chloridbestimmung der Haemolymphe wegen der Kleinheit des Objektes, wegen den Guaninkristallen der Speicherniere und wegen der äusserst wässerigen Konsistenz der Organe grosse technische Schwierigkeiten. Es wurden deshalb indirekte Methoden verwendet.

a) *Silbernitrat-Experimente.*

Die schon erwähnten Befunde der $AgNO_3$-Behandlung zeigen, dass es sich bei den Ventralorganen um Stellen erhöhter passiver Durchlässigkeit handelt. Dafür spricht besonders die Tatsache, dass auch die Ventralorgane toter Milben mit Silbernitrat zur Darstellung gebracht werden können, wobei sich die gleichen Vorgänge abspielen wie beim lebenden Tier. Die Frage, ob die Ventralorgane auch Stellen aktiver Resorptions- und Regulationsfähigkeit darstellen, sollen die folgenden Versuche beantworten.

b) *Chlorid-Experimente.*

Die Funktion als osmoregulatorisches Organ wurde am Beispiel der Chlorid-Ionen geprüft.

Versuch 1 a: Die Milben werden in eine 5 % bzw. 10 % Kochsalzlösung eingelegt. Diese stark hypertonischen Lösungen wirken nach 15 bis 25 Minuten tödlich. Nach 1 bis 24 Stunden werden die Tiere nach gründlichem, kurzem Abspülen in destilliertem Wasser in die Silbernitratlösung gebracht. Verschiedene Konzentrationen der $AgNO_3$-Lösung beeinflussen lediglich die Geschwindigkeit des nun folgenden Ablaufes. Sofort beginnt ein weisser Niederschlag aus den Ventralorganen heraus zu quellen, in sehr geringem Masse auch aus dem After und zum Teil aus dem Tokostom. Diese aus AgCl bestehenden Quellkuppen färben sich nach einiger Zeit bräunlich. Werden die Tiere vor dem Eintauchen nicht genügend gespült, so

VOL. 35 1954

reagiert die noch der Körperoberfläche anhaftende NaCl-Lösung ebenfalls sofort mit dem $AgNO_3$ unter Bildung des AgCl-Niederschlags.

Dieses Ergebnis demonstriert nochmals die passive Durchlässigkeit der Ventralringe und beruht offenbar auf folgenden Vorgängen: Bei genügend langer Einwirkung wird der ganze Milbenkörper von der hypertonischen Kochsalzlösung völlig durchtränkt, nachdem das Innere infolge des zuerst einsetzenden starken Wasserentzuges stark geschrumpft ist. Beim Einlegen in die hypotonische Silbernitratlösung dringt die Kochsalzlösung oder zum mindesten die Cl-Ionen an den durchlässigen Stellen nach aussen, wo sofort die chemische Umsetzung der beiden Lösungen stattfindet. Gleichzeitig ist zu erwarten, dass der hypertonische Milbenkörper rasch Wasser aufsaugen wird. Das scheint tatsächlich der Fall zu sein. Bei Milben, die in Seitenlage in der Silbernitratlösung liegen, kann mit dem Mikroskop bei Auflicht an Hand feiner Verunreinigungen eine Strömung aus allen Richtungen auf die Bauchseite zu gesehen werden. Ich glaube nicht, dass es sich dabei lediglich um Konvektionsströmungen handelt, die durch den Ersatz des an den Ventralringen umgesetzten Silbernitrates bedingt sind.

Versuch 1 b: Der gleiche Versuch kann mit Milben ausgeführt werden, die nicht in die Kochsalzlösung eingelegt, sondern auf Futterböden gesetzt worden sind, die 5 % bzw. 10 % NaCl enthalten. Die Hypertonie des Futters wird ebenfalls nicht ertragen, sodass die Milben, vor allem auf dem 10 %-NaCl-Futter zum Teil schon nach wenigen Minuten sterben. Beim Übertragen in die Silbernitratlösung entstehen wiederum die Quellkuppen aus AgCl, und zwar auch bei Individuen, die — durch ununterbrochene, direkte Beobachtung festgestellt — auf den Salzböden nicht gefressen haben.

Versuch 2 a: Lebende und tote Milben werden je während 10 bis 20 Minuten in 10 %-NaCl-Lösung eingelegt und hierauf in die Silbernitratlösung übertragen. Da diese Konzentration erst nach 15 bis 25 Minuten den Tod der Versuchstiere herbeiführt, anderseits aber eine genügend starke Hypertonie aufweist, um in der gewählten Zeitspanne von 10 bis 20 Minuten in ausreichenden Mengen in die Milben einzudringen, ist es möglich, die am Anfang des Experimentes noch lebenden Milben tatsächlich während der ganzen Versuchsdauer am Leben zu erhalten. Wir können dabei folgende Ergebnisse registrieren: Die toten Tiere zeigen das uns schon bekannte Hervorquellen des weissen Silberchloridniederschlages, bei den lebenden Milben werden aber die Ventralringe auf die uns ebenfalls bekannte Weise braun gefärbt. Die toten wie die lebenden Milben sind also während der gleichen Zeit derselben hohen Chloridkonzentration ausgesetzt gewesen, aber nur die toten Tiere sind während dieser Zeitspanne von den Chlor-Ionen überflutet worden, während den lebenden Milben eine Regulation ihres Chloridspiegels in gewissem Rah-

men gelungen ist. Die Lebenstätigkeit wirkt sich in diesem Falle als Hemmung des Ioneneintrittes durch die Ventralorgane aus.

Versuch 2 b: Bei lebenden Milben werden zuerst die Ventralorgane durch Silbernitrat leicht imprägniert, bevor sie der im Versuch 2 a beschriebenen Behandlung mit stark hypertonischen Kochsalzlösungen unterworfen werden. Dieser Versuch kann nur mit den wiederstandsfähigsten Individuen durchgeführt werden, denn zu den Schädigungen durch die hypertonische NaCl-Lösung gesellt sich die ebenfalls tödliche Wirkung des $AgNO_3$. Diese Versuchsgruppe zeigt nun folgendes: Unmittelbar nach dem Einlegen in die 10 % NaCl-Lösung sterben die imprägnierten Tiere, während Kontrolltiere in Wasser noch weiterleben. Bei der Weiterbehandlung verhalten sich dann die imprägnierten Tiere wie die von Anfang an toten Milben, d.h. sie bilden weisse Quellkuppen. Damit ist gezeigt, dass durch die Silberimprägnation die osmoregulatorische Funktion der Ventralorgane ausgeschaltet wird. GLOOR und CHEN (1950) konnten mit Hilfe der direkten Chloridbestimmung bei Drosophilalarven ein analoges Versagen der imprägnierten Analorgane zeigen.

VOL. 35 1954

c) *Die Todesursache nach Silbernitrat-Behandlung.*

Die Frage, ob das Eintreten des Todes nach $AgNO_3$-Behandlung auf dem Ausfall der Osmoregulatoren oder auf einer allgemeinen Schädigung des Oganismus durch die giftige Substanz beruht, muss nach unseren Befunden folgendermassen beantwortet werden.

Im eben erwähnten Versuch 2 b ist die Ausschaltung der Ventralorgane die primäre Todesursache. Die imprägnierten Milben sterben unmittelbar nach der Übertragung in 10 % NaCl. Diese starke Hypertonie, welche infolge des Ausfalles des Regulationsmechanismus unvermindert auf den Körper einzuwirken vermag, ist die sekundäre Ursache des schnellen Sterbens. Nicht nur die ins Wasser verbrachten Kontrolltiere, sondern auch in der Silbernitratlösung gelassene Milben bleiben länger am Leben, trotzdem im letzteren Falle sicher auch eine Hypertonie vorliegt. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich leicht erklären: Eine 10 % NaCl-Lösung ist etwa drei mal so stark osmotisch wirksam wie eine gleichprozentige $AgNO_3$-Lösung, da sich die Äquivalentgewichte von NaCl und $AgNO_3$ wie 1:3 verhalten. Die Silbernitratlösung ist also dem Milbenkörper gegenüber weniger hypertonisch als eine gleichkonzentrierte Kochsalzlösung.

Werden Milben mit imprägnierten Ventralorganen in isotonische, physiologische Kochsalzlösung verbracht, so sterben sie auch. Das zeigt, dass eine direkte tödliche Schädigung des Organismus durch das $AgNO_3$ ebenfalls stattgefunden hat, denn die Ausschaltung der Ventralorgane ist in der physiologischen Kochsalzlösung, in welcher ja keine Osmoregulation notwendig wird, bedeutungslos.

Beide Todesursachen — Ausfall der Osmoregulatoren und allgemeine Schädigung des Organismus — sind also nebeneinander wirksam. Welche von beiden im konkreten Einzelfall schneller wirkt, also als primär anzusehen ist, wird durch die jeweils vorliegenden Umstände entschieden. Da Isotonie zwischen Milbe und Futtermedium sehr selten auftreten dürfte, ist in der überwiegenden Anzahl der Fälle die Blockierung der Ventralorgane als primäre Todesursache anzunehmen. Sekundär tritt

dann eine allgemeine Vergiftung oder eine Störung des Wasserhaushaltes infolge Hyper- bzw. Hypotonie des Futtermediums ein.

d) *Organgrösse und Salzkonzentration.*

Wenn es sich bei den Ventralringen tatsächlich um osmoregulatorische Organe handelt, muss angenommen werden, dass unter Umständen durch verschiedene Salzkonzentrationen eine Grössenänderung der Bauchringe erzielt werden könnte, wie das bei den Analpapillen wasserlebender Insektenlarven geschehen ist. Die am Anfang erwähnte Zufallsbeobachtung über die Grössenvariation der Ventralorgane deutet bereits in dieser Richtung.

Bei adulten Milben kann auf keine Art und Weise eine Vergrösserung oder Verkleinerung der Organe erzielt werden. Dies ist eigentlich zu erwarten, handelt es sich doch bei den Ventralorganen um Felder, die von einem massiven Cuticulawall begrenzt werden. In anderem Zusammenhang ausgeführte Messungen haben gezeigt, dass die Körpergrösse von *H. laboratorium* wohl starke Schwankungen zeigen kann, dass dabei aber die stark chitinisierten Teile wie Gnathosoma und die Beinglieder ihre feste, erblich fixierte Länge behalten. Lediglich die farblose, durchsichtige, relativ dünne Körpercuticula scheint einer gewissen Dehnung oder eines beschränkten Flächenwachstumes fähig zu sein. Die konstant bleibenden Proportionen werden bei jeder Häutung festgelegt.

Wenn also eine Veränderung der Ventralorgane erzielt werden soll, muss auf die Ontogenese eingewirkt werden. Zu diesem Zwecke wurden vier bzw. fünf verschiedene Nährböden verwendet. Pulverisierter Davis-Agar wurde unter Beigabe von Bäckerhefe in verschiedenen Kochsalzlösungen aufgelöst und zwar

Boden A in Aqua destillata
Boden B „ 0,9 % NaCl-Lösung
Boden C_1 „ 2 % „ „
Boden C_2 „ 3 % „ „
Boden D „ 10 % „ „

Bei diesen Angaben handelt es sich um die Konzentrationen der Ausgangslösungen. Es wird damit nicht gesagt, dass die in den fertigen Agarböden osmotisch wirksamen Salzkonzentrationen genau die gleichen seien, da ein Teil der Ionen irgendwie gebunden werden könnte. Besonders der Boden A wird kaum absolut salzfrei sein, da z.B. in der beigefügten Hefe Spuren von Salzen vorhanden sind. Das hat aber auf die Bewertung der Experimente keinen Einfluss, da es lediglich auf relative und nicht auf absolute Werte ankommt.

Die Konzentration des Bodens D liegt weit ausserhalb der biologischen Grenzen. Die eingesetzten Milben zeigen sehr bald starke Schrumpfungen und die ersten Milben sterben schon nach 10 Minuten. Nach einer Stunde sind keine mehr am Leben, ausgenommen die Deutonymphen (ausser dem Mund fehlen ihnen auch die Ventralorgane). Die Konzentration des Bodens C_2 liegt

gerade an der Grenze des Erträglichen; ein kleiner Teil der eingesetzten Milben bleibt am Leben. Die auf die Böden A, B und C_1 gesetzten Milben entwickeln sich normal.

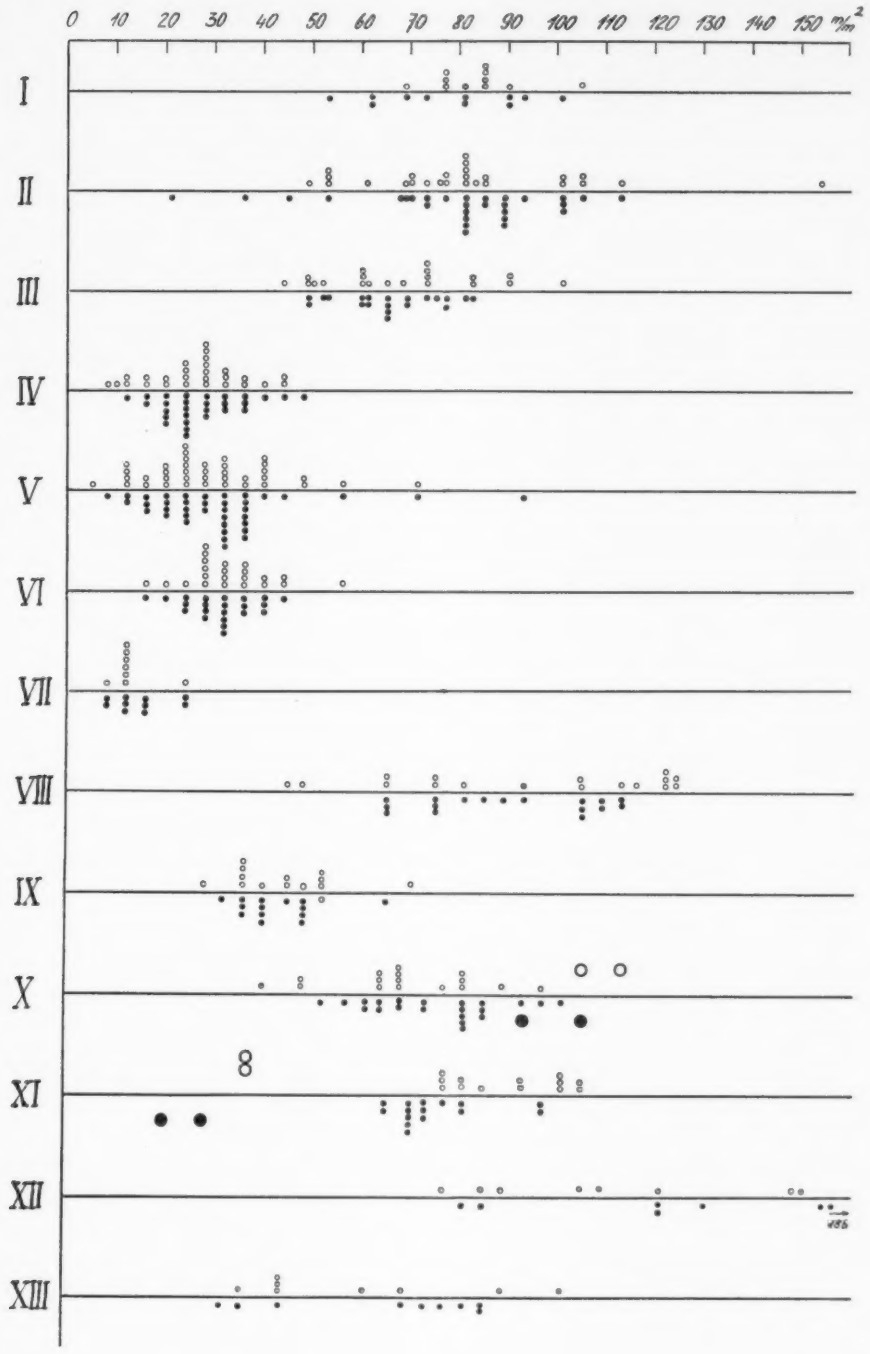
Für die Versuche wurden mehrere Dutzend Adulti während eines Tages zur Eiablage auf den erwähnten Böden gelassen. Die jungen Milben wurden während ihrer Entwicklung zweimal auf frische Böden umgesetzt, um eine unkontrollierbare Veränderung des Nährmediums durch einsetzende Fäulnisprozesse zu verhindern.

Bei der Zusammenstellung der Ergebnisse in Abb. 52 sind der Übersichtlichkeit halber nur die Weibchen berücksichtigt. Die Männchen zeigen die gleichen Verhältnisse, wobei lediglich alle Werte etwas tiefer liegen und die Unterschiede etwas weniger ausgeprägt sind. Die mittels eines Prismas hergestellten Zeichnungen der Ventralorgane wurden mit einem Planimeter ausgemessen. Oberhalb des waagrechten Striches sind die Massgrössen der cranialen, unterhalb des Striches diejenigen der caudalen Bauchringe in mm^2 aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert einen einzelnen Bauchring. I zeigt die Verhältnisse der für die Versuche II—IV verwendeten Adulti. II und III veranschaulichen die Organgrössen von Milben, die sich auf dem Boden A entwickelt haben; die Ergebnisse zweier Zuchtschalen werden getrennt dargestellt. IV—VI demonstrieren die Ergebnisse bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Es zeigt sich nun mit aller Deutlichkeit, dass im extrem salzarmen Milieu die Ventralorgane viel grösser ausgebildet werden als in Medien, die einen normalen Salzgehalt oder Ionenüberfluss zeigen. Die für die Ionenresorption wirksame Fläche wird also wie erwartet stark vergrössert. Die auf diese Weise erzielten Organgrössen erreichen, wie schon erwähnt, die früher beobachteten Maximalwerte nicht. Leider wurden diese damals nicht mit der hier angewendeten Methode ausgemessen, doch zeigen die in Zeile XII dargestellten Werte aus einer wässerigen Zucht, dass noch grössere Bauchringe durchaus möglich sind und tatsächlich auch ausgebildet werden.

VOL. 35 1954

Abb. 52. Flächenentwicklung der Ventralorgane von Weibchen unter verschiedenen Aussenbedingungen I. Die Grössenangaben in mm^2 beziehen sich auf die ausgemessenen Zeichnungen. Oberhalb des Striches: craniale Ringe. Unterhalb des Striches: caudale Ringe.

I. Ausgangsform für die Zuchten II—VI
II. Futterboden mit Aqua dest., Schale 1
III. „ „ „ „ 2
IV. „ „ 0,9 % NaCl
V. „ „ 3 % „
VI. „ „ 2 % „
VII. Ontogenese wie V, als Adulti wie II/III gehalten
VIII. Wässeriger Futterboden
IX. Trockener Futterboden
X. Mutter (grosse Kreise) grosse Ventralorgane } gleiches Futter
XI. „ „ kleine „ }
XII. Wässerige Massenzucht } gleichen Alters
XIII. Trockene Massenzucht }


0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 m/m²
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
IX
X
XI
XII
XIII
8

Proben aus trockenen und wässerigen Massenzuchten auf *Drosophila*-Standard-Futter (XII und XIII) bestätigen die frühere Beobachtung, dass auf wässerigem Futter relativ grössere Ventralorgane ausgebildet werden als auf trockenem Futter. Die experimentelle Überprüfung mit Agar-Hefe-Futter zeigte dasselbe (VIII und IX). Auch diese Beobachtung lässt sich mit Konzentrationsunterschieden freier, osmotisch wirksamer Ionen erklären. Das Wasser, das zum Teil durch die Fäulnis freigesetzt wird, zum grösseren Teil als Kondenswasser frisch dazu kommt, führt zu einer Verdünnung, zu einer Herabsetzung der Ionenkonzentration, was eine Vergrösserung der Ventralorgane nach sich zieht.

Zeile VII illustriert noch die Tatsache, dass einmal ausgebildete Ventralorgane nicht mehr geändert werden. Auf C_1 aufgezogene Milben werden als Adulti längere Zeit auf Böden des Typus A gehalten. Periodisch vorgenommene Stichproben ergaben keine Grössenveränderung der Organe.

Folgender Einwand muss noch entkräftigt werden. Es könnte sich bei den Milben mit grossen bzw. kleinen Ventralringen um verschiedene Rassen handeln, d.h. die Art der Ausbildung wäre erblich festgelegt. Gegen diese Ansicht sprechen zwei Befunde. Erstens wurden als Eierlieferanten für jede Versuchsschale Dutzende beliebiger Adulti verwendet, die sicher keine genetische Einheitlichkeit zeigten. Trotzdem ergaben sich in der Folgegeneration ganz klare Unterschiede (Abb. 52 II—VI). Zweitens zeigt das direkte Experiment, bei welchem nur die Nachkommen eines einzigen Weibchens untersucht wurden (X und XI), dass sich die Ringgrösse nur nach dem Salzgehalt und nicht nach der Abstammung richtet.

Selbstverständlich wurde auch die absolute Grösse der untersuchten Milben berücksichtigt. Bei den Milben, welche auf Boden A herangewachsen sind, handelt es sich keineswegs um Riesenformen (Abb. 53). Ihre Idiosomenlänge variiert genau gleich wie diejenige von Milben, die auf salzreichen Medien gehalten wurden zwischen 346 μ und 364 μ. Ihre Ventralorgane sind nicht nur absolut, sondern auch relativ grösser als bei den Versuchstieren der Böden B und C.

Aus diesen Ergebnissen können wir zwei Schlüsse ziehen:

1. Die Ventralorgane sind tatsächlich Osmoregulatoren, welche durch verschiedene Salzkonzentrationen in ihrer Grössenausbildung beeinflusst werden können.

2. Die aktive Regulationstätigkeit beruht hauptsächlich (vielleicht ausschliesslich) auf Ionenresorption und nicht auf Ionenabgabe durch die Ventralorgane. Das folgt aus der Tatsache, dass die Ventralringe in hypotonischen Medien grösser, in hypertonischer Umgebung kleiner ausgebildet werden.

VOL. 35 1954

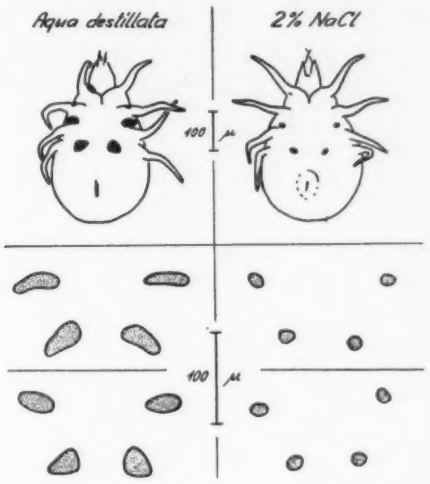


Abb. 53. Abhängigkeit der Ventralorgane vom Chloridgehalt des Zuchtmediums. Bei gleicher Körpergrösse werden die Ventralringe auf salzarmem Medium grösser ausgebildet als auf salzreichem Futterboden. Die Milbe aus der Aqua dest.-Zucht zeigt accessorische Bauchringe.

e) *Zucker-Experimente.*

Ähnliche Versuche wie diejenigen mit NaCl wurden mit Zucker durchgeführt. Zum üblichen Agar-Hefe-Futter wurden verschiedene Mengen Zucker (bis 30 %) beigegeben, während andere Zuchten zuckerfrei blieben. Da nur tote Hefe verwendet wurde, änderte sich während des Versuches die Ausgangskonzentration nicht. Die auf solchen Böden aufgezogenen Milben zeigen aber k e i n e Grössenunterschiede der Ventralorgane (Abb. 54).

Stark hypertonische Zuckerböden wirken tödlich. Bereits die noch lebenden Tiere verlieren einen Teil ihres Körperwassers und schrumpfen. Die toten Tiere fallen dann völlig zusammen, während sie sonst tagelang ihre pralle Fülle behalten. Genügend hoher Zuckergehalt führt auch zum Tode der Deutonymphen (S. 172).

C. DER IMPRÄGNIERUNGSVORGANG.

Verschiedene Beobachtungen zeigen, dass es sich bei der Darstellung der Ventralorgane durch Silbernitrat um eine Silberimprägnation handelt.

1. Einfluss des Lichtes.

Wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt wurde, tritt eine Färbung auch dann ein, wenn die Behandlung während oder sogar vor Erscheinen der ersten Bräunung abgebrochen wird und die Milben durch Waschen in destilliertem Wasser von anhaftenden $AgNO_3$-Resten befreit werden. Das ist aber nur der Fall, wenn die Tiere dem Lichte ausgesetzt sind. Je intensiver das Licht ist, umso schneller vollzieht sich der Vorgang. Im Dunkel gehaltene Tiere zeigen selbst nach Stunden keine Imprägnation, ins Licht zurückversetzt, tritt diese

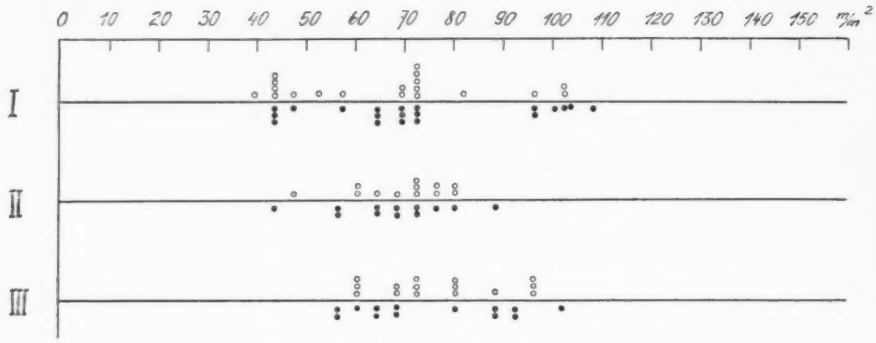


Abb. 54. Flächenentwicklung der Ventralorgane von Weibchen unter verschiedenen Aussenbedingungen II. Die Grössenangaben in mm² beziehen sich auf die ausgemessenen Zeichnungen. Oberhalb des Striches: craniale Ringe. Unterhalb des Striches: caudale Ringe.
I. Ausgangsformen für die Zuchten II—III
II. Zuckerfreier Agarboden
III. Zuckerhaltiger Agarboden.

aber mit der gewohnten Geschwindigkeit ein. Werden Milben, die erst eine schwache Färbung zeigen, ins Dunkel gebracht, so behalten sie diese Färbung bei; erst wenn sie wieder dem Lichte ausgesetzt werden, vollzieht sich die Intensivierung über dunkelbraun bis schwarz. Genau dasselbe zeigen die weitaus grösseren Analorgane der Drosophilalarven: Einwirkung von Silbernitrat im Dunkeln erzeugt lediglich einen leichten weissen Belag, der sich erst im Lichte zu bräunen beginnt. Dabei entsteht zuerst ein leichter rötlicher Schimmer, der sich über alle Zwischenstufen von gelb und braun schliesslich in eine dichte, schwarze, glänzen-Kruste umwandelt.

2. Oberflächliche Krustenbildung.

Der schwarze Belag bildet sich an der Oberfläche der Cuticula. Durch Kratzen mit feinen Präpariernadeln kann er stückweise entfernt werden. Beim Mazerieren mit heisser Kalilauge und mit Milchsäure wird der Belag nur schwer und schollenweise abgelöst.

3. Unentbehrlichkeit der Hypodermis.

Eine Imprägnation tritt nur dann ein, wenn die Cuticula in unmittelbarer Verbindung mit der Hypodermis steht. Milben, die in heisser Milchsäure mazeriert werden, bei denen also nur noch das Cuticularskelett vorhanden ist, verlieren die Färbbarkeit der Ventralringe. Individuen, bei denen im Innern der Verwesungsprozess schon weit fortgeschritten ist, zeigen ebenfalls herabgesetzte Färbbarkeit: bei Einwirkung von 5 % $AgNO_3$ tritt nach 10 Minuten erst bei 1 % der Tiere eine beginnende Imprägnation ein.

VOL. 35 1954

4. Diskussion.

Bei der Anfärbung der Ventralorgane mit $AgNO_3$ spielen sich zwei Vorgänge ab: 1. Bildung des weissen AgCl-Niederschlages, 2. Bräunung des Niederschlages infolge Reduktion des AgCl zu Ag.

Die angeführten Beobachtungen deuten darauf hin, dass auch bei *H. laboratorium* die unter der Cuticula der Ventralringe gelegene Hypodermis besondere, histologisch allerdings nicht nachgewiesene Zellen ausbildet, die den von GETMAN und COPELAND an Fischen beschriebenen „Chloridzellen" entsprechen. GLOOR und CHEN fanden bei Drosophilalarven ebenfalls besonders gestaltete Zellen. In diesen Chloridzellen sind Chlor-Ionen angehäuft. Die darüber befindliche Cuticula muss sehr durchlässig sein. Bei der Einwirkung von Silbernitrat kommt es in den Zellen zur Bildung des unlöslichen Silberchlorides. Diese Annahme erhält eine starke Stütze durch die Feststellung von GLOOR und CHEN, wonach bei Drosophilalarven nach Silbernitratbehandlung im Plasma der Analorganzellen dunkle Granula auftreten, die besonders häufig in dem der Cuticula gegenüberliegenden Plasmasaum sind. Die Ausbildung eines solchen Niederschlages führt zu einer sofortigen Auflösung der plasmatischen Intimstruktur. Das bedeutet aber nichts anderes als eine Herabsetzung oder Zerstörung der Funktionstüchtigkeit der betroffenen Zellen.

Die Ausbildung der oberflächlichen Kruste kommt so zustande, dass die in und auf der Cuticula liegenden Chlor-Ionen ebenfalls mit dem Silbernitrat reagieren, wobei es zu einem ständigen Ersatz der Ionen aus den Chloridzellen kommt.

Das Verhalten der mazerierten Milben, bei denen ausser den Chloridzellen auch die in der Cuticula befindlichen Chlor-Ionen herausgelöst worden sind, zeigt, dass es sich bei der Imprägnierbarkeit nicht um eine Eigenschaft der Cuticula allein handelt. Bei verwesenden Milben kann es bei starkem Zerfall der Chloridzellen höchstens noch zu einer schwachen Färbung der Ventralorgane kommen.

Die Reduktion zu elementarem Silber kann durch Reduktionsmittel oder durch das Licht erfolgen. In lebenden und toten Zellen sind reduzierende Stoffe, z.B. Aldehyde immer vorhanden. Die Reduktion bei der Imprägnation beruht aber nur zum kleinsten Teil auf der Einwirkung reduzierender Zellbestandteile. Die Reduktion von AgCl durch das Licht kann im Reagensglas gezeigt werden. Ein solcher in-vitro-Versuch benötigt aber eine doppelt so grosse Zeitspanne, um die gleiche Bräunung zu erreichen wie die Ventralorgane. Diese raschere Reduktion durch die Milben kann nicht auf einer zusätzlichen Wirkung reduzierender Zellsubstanzen beruhen, denn sonst müsste bei den im Dunkel gehaltenen Tieren mit der Zeit mindestens eine schwache Bräunung auftreten. Viel wahrscheinlicher scheint das Vorhandensein eines Sensibilisators in den Zellen. Nach einer nicht zu kurzen $AgNO_3$-Behandlung

Abb. 55. Extreme Lagevariation der Ventralringe bei einem Männchen.

entsteht bei genügend langer Lichteinwirkung schliesslich ein völlig schwarzer Silberspiegel.

D. ZAHL- UND LAGEVARIATIONEN DER VENTRALRINGE.

Leichte Asymmetrien in der Anordnung der Ventralorgane sind relativ häufig (Abb. 4 a). Eine sehr starke Verschiebung eines der hinteren Ringe wurde bei einem Männchen konstatiert, bei welchem sich der craniale und der caudale Ring der einen Seite berührten (Abb. 55).

Bei der Imprägnation mit Silbernitrat wurden einige Male zusätzliche Ventralringe beobachtet. Diese liegen an homologer Stelle cranial der Coxae II und sogar Coxae I, also vor den regulären Ringen. Am ungefärbten Tier entziehen sie sich der Beobachtung, da sie keinen Chitinwall besitzen (Abb. 53). Es wäre möglich, dass es sich dabei um erbliche Variationen handelt.

Ähnliche zusätzliche, aber weniger regelmässig begrenzte Flecken entstehen bei genügend langer Einwirkung des Silbernitrates oft an den lateralen Enden des Tokostom-Spaltes (Abb. 56). Sehr wahrscheinlich handelt es sich dabei aber nicht um accessorische Organe, sondern lediglich um Verunreinigungen, die in den Winkeln des Eilegespaltes haften.

Schliesslich bildet sich noch ziemlich bald rund um den Afterspalt eine bräunlich gefärbte, scharf begrenzte Linie, die meist an der caudalen Seite leicht verdickt ist (Abb. 56). Ob diese Struktur eine besondere Bedeutung besitzt, ist unbekannt.

E. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die auf der Ventralseite der *Anoetinae* befindlichen, ringförmigen Chitinstrukturen sind osmoregulatorische Organe.

2. Die Ventralorgane sind Stellen erhöhter passiver Durchlässigkeit sowohl für Kationen (Ag^+) als auch für Anionen (Cl^-).

3. Die Ventralorgane verhindern auf hypertonischem Futterboden das Eindringen von Ionen. Die Ventralorgane sind innerhalb gewisser Grenzen zur Regulation befähigt.

4. Auf salzarmem Untergrund werden grössere Ventralringe gebildet als auf salzreichem Futter. Das deutet darauf hin, dass die Ventralorgane aktiv, gegen das Konzentrationsgefälle Ionen aufnehmen.

5. Zur Regulation des osmotischen Druckes werden nur die kleinen Ionen

VOL. 35 1954

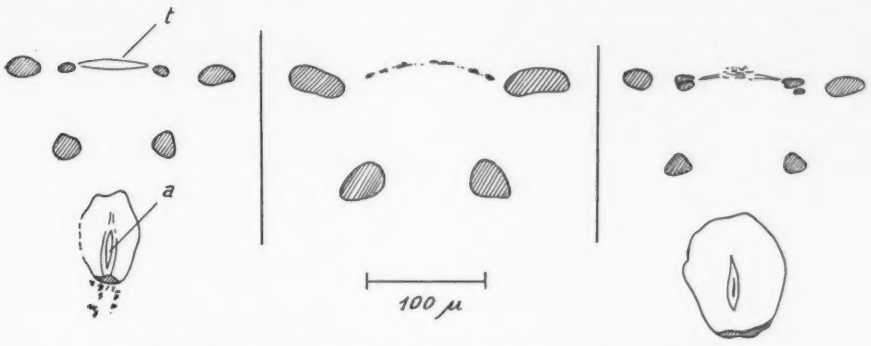


Abb. 56. Accessorische Imprägnationen. *a* After, *t* Tokostom.

verwendet. Die ebenfalls osmotisch wirksamen Zuckermoleküle sind offenbar zu gross, um durch die Ventralorgane eindringen zu können.

6. Die tödliche Wirkung des Silbernitrates kann sowohl auf einer Blockierung der Osmoregulatoren als auch auf einer Schädigung des ganzen Organismus beruhen. In beiden Fällen kommt es durch Bildung des unlöslichen Silberchlorides zu einer Zerstörung der intrazellulären Intimstruktur.

VIII. BEMERKUNGEN ZUR BEKÄMPFUNG VON MILBEN-INFEKTIONEN IN DROSOPHILAZUCHTEN.

Wie schon in der Einleitung bemerkt worden ist, wurden keine systematischen Untersuchungen der Bekämpfungsmöglichkeiten durchgeführt. Trotzdem sind einige diesbezügliche Erfahrungen gesammelt worden.

Sehr viel Chemikalien wirken auf die Milben tödlich oder entwicklungshemmend z.B. Lysol, Nipagin, Chloramin, Sulfothiazol, Benzylbenzoat u.a. Da sie auf die Fliegen im gleichen Sinne wirken, und die Schwellenwerte für Milben und Fliegen sehr nahe beisammen liegen, kommt ihre Anwendung in Drosophilazuchten nicht in Frage.

Ein einziges Weibchen, das als Deutonymphe in eine Zuchtflasche gelangt, kann zum Ausgangspunkt einer neuen Population werden (Arrhenotokie S. 112). Da sich Deutonymphen selbst durch dichte Watteropfe hindurcharbeiten können, ist in verseuchten Laboratorien immer mit Infektionen zu rechnen. Die sicherste und einfachste Methode zur Verhütung von Infektionen besteht nach wie vor darin, die Drosophilazuchten absolut sauber zu halten und vor allem alte, von Milben befallene Zuchtflaschen sofort zu entfernen und zu reinigen. Verseuchte Thermostatenkasten und -räume können durch mehrstündiges Aufheizen auf 35—37° C milbenfrei gemacht werden.

In frisch angesetzten Zuchten ist es möglich, auf folgende einfache Art

und Weise durch *Drosophilae* eingeschleppte Deutonymphen unschädlich zu machen: Entweder wird der Zuckergehalt des Futters stark erhöht. Die dadurch bedingte Hypertonie des Mediums wird von den Tritonymphen, die sich auf dem frischen Futter sofort aus den Deutonymphen entwickeln, oder sogar von diesen selbst nicht ertragen (S. 135). Die Gärung verringert die Zuckerkonzentration sehr bald, sodass ein schädlicher Einfluss auf die ausschlüpfenden Drosophilalarven nicht mehr besteht. Oder man lässt bevor die Fliegen eingesetzt werden den Futterboden solange kräftig gären, bis das Futter maximal angesäuert ist (pH 1—2). Die mit den Fliegen eingedrungenen Deutonymphen gehen auf solchen Böden zugrunde. Später einsetzende Infektionen werden von diesen Böden nicht mehr unterbunden, da ihr pH-Wert sehr bald ansteigt (s. auch JENNI 1951).

IX. ZUSAMMENFASSUNG.

1. In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen an der Milbe *Histiostoma laboratorium* Hughes berichtet, welche mit *Drosophila*-Fliegen im Symphagium lebt.

2. Es wurde die äussere und innere Gliederung untersucht; diese stimmt im wesentlichen mit derjenigen der übrigen *Acaridiae* überein.

3. *H. laboratorium* zeigt arrhenotoke Parthenogenese, d.h. die Männchen entwickeln sich aus unbefruchteten Eiern. Der genaue Mechanismus der Geschlechtsbestimmung, sowie die Chromosomenverhältnisse der Geschlechter konnten nicht nachgewiesen werden.

4. Die postembryonale Entwicklung weist 5 Stadien auf: die sechsbeinige Larve, die Protonymphe, die Deutonymphe, die Tritonymphe und der Adultus, welche alle acht Beine besitzen. Die Entwicklungszeit variiert sehr stark von fünf Tagen bis zu mehreren Wochen und beträgt normalerweise 8—10 Tage.

5. Die Deutonymphe ist heteromorph und sehr widerstandsfähig und vermag monatelang am Leben zu bleiben. Die Organsysteme sind teilweise rückgebildet. Vor allem ist der Darmkanal rudimentär; eine Mundöffnung fehlt. Die Deutonymphe lebt nur von ihren Reservestoffen. Als Besonderheit weist sie eine wohlentwickelte Haftnapfplatte auf, mit der sie sich an die Fliegen anheftet zwecks Weitertransportes und somit zwecks Verbreitung der Art (Phoresie).

6. Die Deutonymphe wird in der Ontogenese von einem Teil der Individuen übersprungen. „Ungünstige" Lebensbedingungen veranlassen prozentual mehr Individuen zur Ausbildung der heteromorphen Deutonymphe, des Hypopus.

7. Als „ungünstige" Umweltsbedingungen wurden Faktoren des sich verschlechternden Futters nachgewiesen, die via Darm und Stoffwechsel auf den Organismus wirken: starke Ansäuerung des Futters, chemische Veränderungen des Futterbodens sowohl durch eigene Fäulnisprodukte als auch durch

VOL. 35 1954

solche unzähliger, im Futter angehäufter Milbenleichen, eventuell auch Futtermangel. Während Futter mit tiefem pH-Wert (pH 3—4) bereits allein zu einer stark vermehrten Ausbildung der Hypopoden führt, konnte das mit den übrigen Faktoren nicht erzielt werden, so dass für diese eine Wirkung nur in der Kombination angenommen werden muss.

8. Neben diesen exogenen Faktoren müssen aber auch innere, genetische Faktoren wirksam sein, welche für die Ausbildung der „Spontan-Deutonymphen", die selbst unter optimalen Bedingungen auftreten, verantwortlich sind.

9. Auch die Lebensdauer des Hypopus, d.h. die Weiterentwicklung der heteromorphen Deutonymphe zur Tritonymphe kann durch Aussenfaktoren weitgehend beeinflusst werden. „Günstige" Umweltsbedingungen, als welche wir das Vorhandensein von hochqualitativem Futter in grossen Quantitäten (Hefemastfutter) ansprechen müssen, veranlassen sämtliche Deutonymphen zur Häutung innert weniger Tage.

10. In Doppelring-Versuchen konnte gezeigt werden, dass für die Auslösung der Häutung der Deutonymphe Geruchsreize (Hefeduft) verantwortlich sind. Es ist denkbar, dass die vom Zentralnervensystem perzipierten Erregungen zur Ausschüttung von Häutungshormonen führen.

11. Die weitere Analyse ergab eine starke häutungsfördernde Wirkung des Wachstumsvitamins B_2 (Lactoflavin) auf die Deutonymphe, während das Vitamin B_1 in reiner Form unwirksam ist, als Tablette, d.h. mit anderen Substanzen vermischt auch eine positive Wirkung zeigt.

12. Es konnte nachgewiesen werden, dass die auf der Ventralseite der *Anoetinae* befindlichen, ringförmigen Cuticularstrukturen (für die bisher keine Funktion bekannt war) zusammen mit der darunter liegenden Hypodermis osmoregulatorische Organe darstellen. Die Grösse dieser Ventralorgane wird während der Ontogenese durch die Salzkonzentration des Futterbodens beeinflusst. Auf salzarmem Futter werden grössere Ventralorgane ausgebildet als auf salzreichen Medien.

X. LITERATURVERZEICHNIS.

ABDERHALDEN, R. 1946. Vitamine, Hormone, Fermente. Benno Schwabe & Co. Basel.

BERLESE, A. 1882. Polymorphisme et parthénogénèse de quelques acariens (Gamasides). Arch. ital. de biol. II, 108—130.

BÖRNER, C. 1902. Arachnologische Studien V: Die Mundbildung bei Milben. Zool. Anz. Bd 26, 99—109.

— 1904. Beiträge zur Morphologie der Arthropoden I: Ein Beitrag zur Kenntnis der Pedipalpen. Zoologica Bd. 27, Lief. 5, Heft 42.

CANESTRINI, G. u. KRAMER, P. 1899. *Demodicidae* und *Sarcoptidae*. Das Tierreich, Lief. 7.

CLAPARÈDE, E. 1868. Studien an Acaridien. Ztschr. wiss. Zool. Bd. 18, 445.

COOPER, K. W. 1937. Proc. Nat. Acad. Sci. 23. 41—44.

COPELAND, D. E. 1948. The cytological basis of chlorid transfer in the gills of *Fundulus heteroclitus*. J. of Morph. 82, no. 2.

— 1950 a. Chlorid excretion in the head region of *Fundulus heteroclitus*. Biological Bulletin, Vol. 99, no. 3, 381—385.

— 1950 b. Adaptive behaviour of the chlorid cell in the gills of *Fundulus heteroclitus*. J. of Morph. 87, no. 2.

DUFOUR, L. 1839. Ann. des sciences natur. Ser. 2, T. XI, 287.

DUGÈS, A. 1834. Ann. des sciences natur. Ser. 2, T. I, 37.

FRÖBRICH, G. 1939. Untersuchungen über Vitaminbedarf und Wachstumsfaktoren bei Insekten. Ztschr. vergl. Physiol. Bd. 27, 335—383.

FUMOUZE, A. u. ROBIN, CH. 1867. Mémoire anatomique et zoologique sur les acariens des genres *Chelytus, Glycyphagus* et *Tyroglyphus*. Journ. de l'anat. et de la physiol. T. IV, 505—528; 561—601.

— 1868 a. Recherches zoologiques et anatomiques sur les Glycyphages. Journ. de l'anat. et de la physiol. T. V. 66—92.

— 1868 b. Observations sur une nouvelle espèce d'acariens du genre *Tyroglyphus*. Journ. de l'anat. et de la physiol. T. V. 287.

GETMAN, H. C. 1950. Adaptives chances in the clorid cells of *Anguilla rostrata*. Biological Bulletin Vol. 99, no. 3, 439—445.

GLOOR, H. u. CHEN, P. S. 1950. Über ein Analorgan bei Drosophilalarven. Rev. Suisse de Zool. T. 57, 570.

GRANDJEAN, F. 1938. Sur l'ontogénie des acariens. C. R. Acad. Sciences Paris, Vol. 206.

HALLER, G. 1880 a. Die Milben als Parasiten der Wirbellosen. Halle.

— 1880 b. Zur Kenntnis der Tyroglyphiden und Verwandten. Ztschr. f. wiss. Zool. Bd. 34, 255—295.

— 1880 c. Acarinologisches. Arch. f. Naturgesch. Jg. 46, Bd. 1, 355—374.

— 1881. Vorläufige Bemerkungen über das Gehörorgan bei Ixodiden. Zool. Anz. Bd. 4, 165.

HENKING, H. 1882. Beiträge zur Anatomie, Entwicklungsgeschichte und Biologie von *Trombidium fuliginosum* Herm. Ztschr. f wiss. Zool. Bd. 37, 553—563.

HENSCHEL, J. 1929. Reizphysiologische Untersuchungen an der Käsemilbe *Tyrolichus casei* Oudemans. Ztschr. f. vergl. Physiol. Bd. 9, 802.

HERFS. 1926. Oekologische Untersuchungen an *Pediculoides ventricosus* (Newp.). Zoologica Vol. 74.

HERTWIG, P. 1920. Haploide und diploide Parthenogenese. Biol. Zentralblatt Bd. 40, 145.

HINDLE, E. u. MERRIMAN, G. 1912/13. The sensory perceptions of *Argas persicus* (Oken). Parasitology Vol. 5.

HUGHES, R. D. 1946. *Drosophila* information service No. 20.

— 1950. The genetics laboratory mite *Histiostoma laboratorium* n.sp. (*Anoetidae*). Journ. of the Washington Acad. of Sciences Vol. 40.

HUGHES, T. E. u. HUGHES, A. M. 1938. The internal anatomy and postembryonic development of *Glycyphagus domesticus* de Geer. Proceedings of the Zool. Soc. of London Vol. 108, 715.

JENNI, W. 1951. Beitrag zur Morphologie und Biologie der Cynipide *Pseudeucoila bochei* Weld, eines Larvenparasiten von *Drosophila melanogaster* Meig. Acta Zool. XXXII, 177—254.

KEYS, A. 1931. Chlorid and water secretion and absorption by the gills of the eel. Ztschr. vergl. Physiol. Bd. 15, 364—388.

— 1933. The mechanism of adaption to varying salinity in the common eel and the general problem of osmoticregulation in fishes. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Vol. 112, 184—199.

VOL. 35 1954

KOCH, H. I. 1938. The absorption of chlorid ions by the anal papillae of *Dipterae* larvae. Journ. exp. Biol. Vol. 15. 152—160.

KOCH, C. L. 1843. Uebersicht des Arachnidensystems. Nürnberg 1839—1843.

KRAMER, P. 1891. Ueber die Typen der postembryonalen Entwicklung bei den Acariden. Arch. f. Naturgesch. Jg. 57, Bd. I, 1—14.

KROGH, A. 1937. Osmotic regulation in fresh water fishes by activ resorption of chlorid ions. Ztschr. vergl. Physiol. Bd. 24, 656—666.

— 1939. Osmotic regulation in aquatic animals. Cambridge comparative Physiology.

LEHMANN, G. 1942. Die Wasserstoffionen-Messung. Joh. Amb. Barth Leipzig.

MARTINI, E. 1923. Ueber Beeinflussung der Kiemenlänge von *Aedes*-Larven durch das Wasser. Verh. intern. Ver. theor. ang. Limnologie 1.

MÉGNIN, M. 1873 a. Sur la position zoologique et de la rôle des acariens parasites connus sous les noms *d'Hypopus, Homopus* et *Trichodactylus*. Compt. rend. hebd. séances de l'acad. scien. T. 77/2, 129—132; 492.

— 1873 b. Mémoire anatomique et zoologique sur un nouvel acarien de la famille des Sarcoptides, le *Tyroglyphus rostroserratus* et sur son hypopus. Journ. de l'anat. et de la physiol. T. IX, 369—388.

— 1874. Mémoire sur les *Hypopus* (Dugès), acariens parasites encore nommés *Homopus* Koch et *Trichodactylus* L. Duf. Journ. de l'anat. et de la physiol. T. X, 225—254.

— 1876. Mémoire sur les métamorphoses des acariens en général et en particulier sur celles des Trombidions. Ann. Sci. Nat. Zoologie, Ser. 6, T. IV, No. 5.

— 1886. Nouvelles études anatomiques et physiologiques sur les Glycyphages. Compt. rend. hebd. des séanc. de l'acad. des sci. T. 103, 1276—1278.

— 1889. Observations anatomiques et physiologiques sur les *Glycyphagus cursor* et *spinipes*. Journ. anat. et physiol. T. XXV, 106—110.

MICHAEL, A. D. 1884. The hypopus-question, or the life-history of certain Acarina. Journ. Linn. Soc. Zool. Vol. XVII, 371—394.

— 1890. Researches into the life-histories of *Glycyphagus domesticus* and *Glycyphagus spinipes*. Journ. Linn. Soc. Zool. Vol. XX, 285—298.

— 1901/1903. British *Tyroglyphidae* I—II. London.

NALEPA, A. 1884/85. Die Anatomie der Tyroglyphiden I—II. Sitz. Ber. kaiserl. Akad. Wiss. Wien. Bd. 90/92, 197—228/116—167.

NORDENSKIÖLD, E. 1909. Zur Spermatogenese von *Ixodes reduvius*. Zool. Anz. Vol. 34.

OFFHAUS, K. 1939. Der Einfluss von wachstumsfördernden Faktoren auf die Insektenentwicklung unter besonderer Berücksichtigung der Phytohormone. Ztschr. vergl. Physiol. Bd. 27, 384—428.

PAGENSTECHER, H. A. 1861. Einiges zur Anatomie von *Tyroglyphus siro*. Ztschr. wiss. Zool. Bd. 11, 120—124.

PÄTAU, K. 1936. Cytologische Untersuchungen an der haploid-partenogenetischen Milbe *Pediculoides ventricosus* Newp. Berl. Zool. Jahrbücher, Zool. Bd. 56, 277.

PERRON, R. 1951. Beeinflussung der Entwicklung der Milbe *Histiostoma laboratorium* Hughes durch Aussenfaktoren. Arch. Jul. Klaus-Stift. f. Vererb. forschg., Soz. anthr. und Rass. hyg. Bd. 26, Heft 3/4, 475—479.

REUTER, E. 1907. Ueber die Eibildung der Milbe *Pediculopsis graminum* Reuter, zugleich ein Beitrag zur Frage der Geschlechtsbildung. Festschrift für Palmén, Helsingfors.

— 1909. Zur Morphologie und Ontogenie der Acariden, mit besonderer Berücksichtigung von *Pediculopsis graminum* (Reuter). Acta Soc. Scient. Fenn., Tome 36, No. 4.

ROBIN, CH. 1868. Recherches sur une espèce nouvelle de Sarcoptides du genre *Glycyphagus*. Journ. anat. et physiol., T. V. 603.

SAJIRO, M. 1951. An atlas of the chromosome numbers of animals. The Iowa State College Press 1951.

SCHRADER, F. 1923. Haploidie bei einer Spinnmilbe. Arch. f. mikrosk. Anat., Bd. 97, 610.

SCHULZE, H. 1923. Ueber die Widerstandsfähigkeit der Dauerformen von wirtschaftlich wichtigen Milben. Naturwissenschaften, Jg. 11, 763.

— 1924 a. Zur Kenntnis der Dauerformen (Hypopi) der Mehlmilbe *Tyroglyphus farinae* (L.). Zentr. bl. f. Bakt., Paras. kunde u. Infekt. krankheiten, Abt. 2, Bd. 60, 536.

— 1924 b. Ueber die Biologie von *Tyroglyphus mycophagus* (Mégnin), zugleich ein Beitrag zur Hypopusfrage. Ztschr. Morph. u. Oekol. 1924, 2.

SCHWEIZER, J. 1922. Beitrag zur Kenntnis der terrestrischen Milbenfauna der Schweiz. Birkhäuser & Co. Basel.

SICHER, E. 1891. Contribuzione alla Embriologia degli *Acari*. Atti Soc. Veneto-Trent. Sci. Nat., Vol. 12, Fasc. 1, 3—22.

SMITH, H. 1930. The absorption and excretion of water and salt by marine teleosts. Am. Journ. Physiol., Vol. 93, 480—505.

SOKOLOW, I. 1934. Untersuchungen über die Spermatogenese bei den Arachniden V: Ueber die Spermatogenese der *Parasitidae* (= *Gamasidae, Acari*). Ztschr. Zellforschg. Vol. 21.

STOLPE, ST. G. 1938. The life-cycle of tyroglyphid mites infesting cultures of *Drosophila melanogaster*. Anat. Rec. T. 72 (Suppl.), 133—134.

SUPINO, F. 1895. Embriologia degli *Acari*. Atti Soc. Veneto-Trent. Sci. Nat., Ser. 2, Vol. 2, Fasc. 1, 242—261.

THOR, S. 1903. Recherches sur l'anatomie comparée des Acariens Prostigmatiques. Ann. Sci. Nat. Zool., Ser. 8, T. 19.

TOTZE, R. 1933. Beiträge zur Sinnesphysiologie der Zecken. Ztschr. vergl. Physiol., Bd. 19.

TROUESSART, E. L. 1904. Sur la coexistence de deux formes d'hypopes dans une même espèce chez les Acariens du genre *Trichotarsus*. Cpt. rend. des séances de la soc. biol., T. 56, 234—237.

VITZTHUM, H. GRAF. 1929. Milben, *Acari*. Die Tierwelt Mitteleuropas, herausg. von P. Brohmer, Bd. 3, Lief. 3.

— 1931. *Acari*. Handbuch der Zoologie, herausg. von Kükenthal, Bd. 3, 2. Hälfte, Lief. 1.

— 1940/43. *Acarina*. Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreichs, Bd. 5, Abt. IV, Buch 5.

— 1949. *Acari*, Milben. In Brohmer: Fauna von Deutschland. Quelle und Meyer, Heidelberg.

WESENBERG-LUND, C. 1943. Biologie der Süsswasserinsekten. J. Springer, Berlin-Wien.

WHEELER, M. 1947. The iodine metabolism of *Drosophila gibberosa* studied by means of radio-iodine J 131. Proc. National Acad. Sci. 33, 298—302.

WIGGLESWORTH, V. B. 1933. The adaption of mosquito larvae to saltwater. Journ. exp. Biol., Vol. 10.

WINKLER, H. 1920. Verbreitung und Ursache der Parthenogenese im Tier- und Pflanzenreich. G. Fischer, Jena.

VOL. 35 1954

THE PLACENTOME IN THE BUFFALO

BY

SAAD HAFEZ

(Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt.)

CONTENTS.

Materials and Methods 178
Results 179
A. Non-pregnant uteri 179
B. Pregnant uteri 180
Discussion 188
Summary 189
Acknowledgements 190
Literature cited 190

L.
5
54

In the course of mammalian evolution, internal gestation was associated with increasing complexity in the pattern of development and attachments of the placenta. The chorio-allantoic placentation of Eutherian mammals have been classified into four types according to the formation of chorionic willi. *Placenta diffusa* is found in the horse, donkey and pig while *placenta zonaria* in most Carnivora; and *placenta discodalis* in Rodentia, Insectivora, Chiroptera and Primates. *Placenta cotyledonaria* is found in Precora, ruminants except the musk deer (AMROSO, 1952) and the camel (HAFEZ, 1954). Amongest "cotyledonary" ruminants, the cotyledons vary remarkably in number, size, form and structure according to the genus and the species. The number of the cotyledons ranges from 160 or 180 in goat and giraffa (polycotyledonary type) to 5 or 6 in the roe deer (oligocotyledonary type), (AMROSO, 1952). Sheep and cow occupy an intermediate position, the number varies from 88 to 96 in the ewe (ELLENBERGER & BAUM, 1921, CLOETTE, 1939) and from 70 to 142 in the cow (RORIK, 1907, SOMMER, 1912, HAMMOND, 1927). Most authorities have agreed that the cotyledons are arranged in rows in the gravid and non-gravid horns of the uterus. The cotyledons are arranged in four irregular rows in sheep (GRANT, 1933) and in a linear arrangement (4 rows in the body, 3 in the middle of horn & 2 in the anterior extremity) in the cow (CRAIG, 1930).

During the first half of pregnancy, there is a rapid growth of the placentomes as measured from their weight, diameter and height. In the cow, foetal attachment begins at the first month and is complete by the third or fourth month (HAMMOND, 1927). In sheep, the cotyledons reach their maximum growth at about the third month (ASSHETON, 1906). During the second half of pregnancy,

there is but little growth of the placentomes as shown in goat (ELLIOTT, 1934, BARCROFT *et al.*, 1934) and sheep (CLOETTE, 1939, BARCROFT, 1946). Late in pregnancy, there is an involuntionary trend in the placentomes whilst at parturition the interlamellar attachments of the foetal and maternal cytoledons fade away. The free surface of the ripe cotyledon (prior to parturition) varies with the genus and the species. It is deeply concave in sheep and goat and less so in the blackbuck (*Antilope cervicapara*). In the cow, it is markedly convex and the base of attachment is constricted to a narrow pedicle. I the Baker's antilope the cotyledons have flat surface and flat attachment (AMROSO, 1952). The cotyledons of ruminants have been classified into those exhibiting slender villi which branch at acute angles and those which possess broad villi which branch at obtuse angles (STRAHL, 1912).

The physiology of pregnancy in the buffalo has been reviewed and augmented by HAFEZ (1952), the gestation being some 314 days. The present investigation is a morphological and anatomical study of the placentome during recent, early and mid pregnancy in the domestic buffalo "*Bos* (*Bubalus*) *bubalis*".

MATERIALS AND METHODS

The materials were the genitalia of fifty-two pregnant and twenty-four non-pregnant Egyptian buffaloes. To start with, the non-pregnant genitalia were dealt with, the two horn of the uterus were cut opened. Notations were made on the size, number and shape of endometrial caruncles in relation to the oestrous cycle. The phase of the oestrous cycle was determined by the macroscopical appearance of the two ovaries. Through the experience gained in earlier studies, it has been possible in the present examination to diagnose with certainty the state of ovarian activity in the non-pregnant mature animals without the necessity of histological examination. Immature and pathological genitalia were excluded from the material. The presence of large graafian follicles in the ovary denoted prooestrus or early oestrus. A pinkish recently organised corpus luteum *periodicum* denoted metoestrus or early dioestrus. A large protruding and veined corpus luteum denoted midioestrus whilst a pale corpus luteum invaded in the ovarian stroma denoted late dioestrus.

The pregnant genitalia represented five stages from recent to midpregnancy, they were classified into six stages (P. I, II, III, IV, V, VI, see Table 1). The age of pregnancy was approximately known by the weight and diameter of the foetus. The diameter of foetus which was measured from the forehead to the top of the tail was more acurate than the foetal weight in determining the age of pregnancy. The genital systems were carefully dissected and the type and degree of foetal attachments were noted. The chorion was then separeted gently from the maternal cotyledons. During all stages of pregnancy under considera-

VOL. 35 1954

Table 1. *Different phases of pregnancy under investigation as measured from diameter and weight of foetus.*

Phase of pregnancy	No. of cases	Foetus			
		Wt. (gm)		Diameter (cm)	
		Range	Mean	Range	Mean
P. I	6	0.1— 1.0	0.7	0.2— 2.0	1.2
P. II	16	1.8— 9.5	4.2	1.6— 5.9	3.5
P. III	18	28 — 171	97.2	8.9—16.0	12.9
P. IV	6	202 — 350	282.3	16.6—21.0	19.1
P. V	4	932 —1 870	1 541.7	26.3—40.4	32.2
P. VI	2	2 420 —3 522	2 971.0	38.5—44.8	41.7

tion, the foetal cotyledons were freed from the maternal cotyledons with ease. It was not necessary to soak the material in formalin to affect separation. The position, number, shape and diameter of the maternal cotyledons were recorded, also the colour of both cotyledonary and intercoryledonary areas of the endometrium. The micro-anatomy and the vasculirization of the foetal-maternal attachments were studied under a dissecting-microscope.

The conceptus was completely removed and the uterus was freed from fat and other connective tissue except the attached part of the broad ligament. The two uterine horns were dissected from each other (there was no proper uterine body) and from the cervix at the internal oss. The weight of the gravid and non-gravid horns were recorded. The maternal cotyledons were then dissected from each uterine horn. They were classified according to size, measured and then counted. The cotyledons content of each uterine horn was acurately weighed fresh without squeezing the lymph content. Wet towels were used throughout the investigation to cover the material in order to minimize the moisture loss by evaporation. Samples were taken for histological studies (serial sections). When the material accumalated they were drawn and photographed. This work was carried out at the Animal Breeding Department, Faculty of Agriculture, Cairo, Egypt.

RESULTS.

A. *Non-Pregnant uteri.*

During non-pregnancy the endometrium was subdivided into two parts, the uterine caruncles and the intercaruncular areas. These caruncules were essentially local thickenings of the sub-epithelial dense connective tissue which elsewhere existed as a thin layer beneath the epithelium. They were well vacularised, the small blood vessels tending, on the whole, to run in a direction at right angles to the surface. The cotyledonary burrs were all more or less of the same

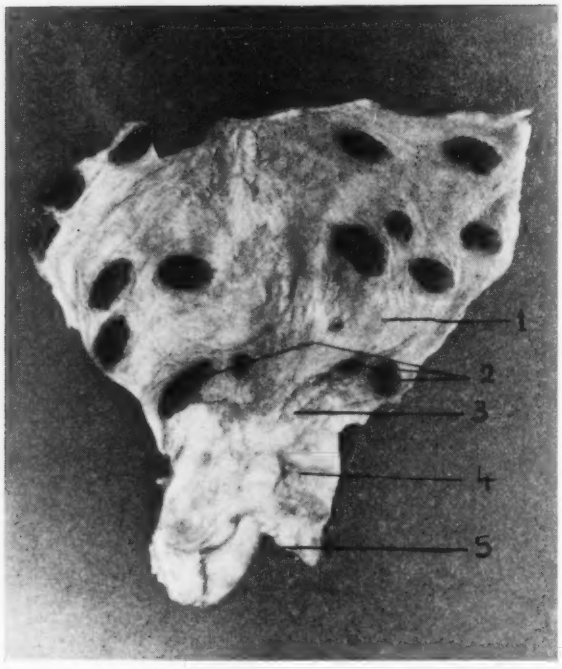


Fig. 1. The maternal cotyledons near the internal oss—the cervix and the exterior part of the uterus being cut opened. 1. intercotyledonary area.—2. maternal cotyledon.—3. internal oss.—4. cervix.—5. external oss.

size and were visible to the naked eye as small circular areas on the surface of the uterine mucous membrane. Their size varied according to the stage of the oestrous cycle. In mid-dioestrus they were indistinguishable from the surface of the mucosa whilst during oestrus and metoestrus they appeared to be more prominent. The caruncles were observed in linear arrangement and in a few cases they were irregular in distribution. Three, four and five rows were observed in the one uterus. The number of caruncles in both horns varied from 90 to 180 with an average of 140. There was no significant difference between the number in the right and left horns.

B. *Pregnant uteri.*

During pregnancy there was considerable oedema and increased vascularity both in the maternal cotyledons and intercotyledonary areas. In the former the stromal connective tissue was more vascular than elsewhere. In stage "P. I" there was loose attachment of membranes to the maternal cotyledons. In stage "P. II" the villi appeared on the surface of the chorionic membrane while in "P. III" the foetal cotyledons were visibly arranged in rows and had free surfaces which fitted into the concavities of the protruding maternal cotyledons.

VOL. 35 1954

In stage "P. IV" there was a fair degree of adherance between the chorionic villi and the interlocking lamellae of the maternal cotyledon. Before attachment was effected, the uterine epithelium covering the surface and base of maternal cotyledons was completely denuded. As pregnancy advanced there was an increase in the number and size of blood capillaries and lymphatics. In stages "P. V & P. VI" there was a large system of branching in the placentomes, separation of foetal and maternal cotyledons was not easily affected.

The foetal membranes reached their maximum length very early in pregnancy, it was some 100 cm. while the foetus was just visible to the naked eye. After reaching maximum length, the fluids (amnion & allantois) started to accumalate in the central portion (around the foetus). In the cotyledonary areas of the trophobast, villi were first developed as buds. The villi fitted into depressions or crypts on the surface of the maternal cotyledons, increased in length and branched in different directions as pregnancy advanced. The foetal villi were slender and richly vacular. Near the surface of the maternal cotyledons, the villi were irregularly branched whilst in the depths of the crypts they tended to be arranged in parallel rows at right angles to the surface of the maternal cotyledon. In the intercotyledonary region, villi were never observed. The maternal cotyledons were distributed all over the endometrium and even near the internal oss, next to the cervix (see Figure 1). The shape, number and size of the maternal cotyledons varied amongst the two horns according to the stage of pregnancy (see Figure 2). The maternal cotyledons when freed from the foetal attachments had a pinkish colour and a spongy appearance with a high content of lymph. Their shape was irregular especially by mid-pregnancy (Figure 3).

In the gravid horn, the average number of maternal cotyledons varied from 31.4 in stage "P. II" to 89.0 in stage "P. VI". In the non-gravid horn, the average number ranged from 10.6 in stage "P. II" to 57.5 in stage "P. VI". The maximum number was 110 in the gravid horn and 107 in the non-gravid. The number of cotyledons in the gravid was in excess of that in the non-gravid, sometimes as much as 600 %, this variation was highest in early pregnancy (P. II & P. III). The diameter of the maternal cotyledons increased as pregnancy advanced. In the gravid horn, the average diameter varied from 1.2 cm. in stage "P. II" to 6.1 cm. in stage "P. VI". In the non-gravid horn, the average diameter ranged from 0.2 cm. in stage "P. II" to 3.1 cm. in stage "P. VI". Table 2 shows that the number of maternal cotyledons reach its maximum in stage "P. IV" in both horns whilst the diameter was increasing enormously until the last stage (P. VI). The cotyledons of the largest diameter were situated near the middle of the allanto-chorion sac opposite the dorsum of the foetus. Figure 4 shows the following observations:—

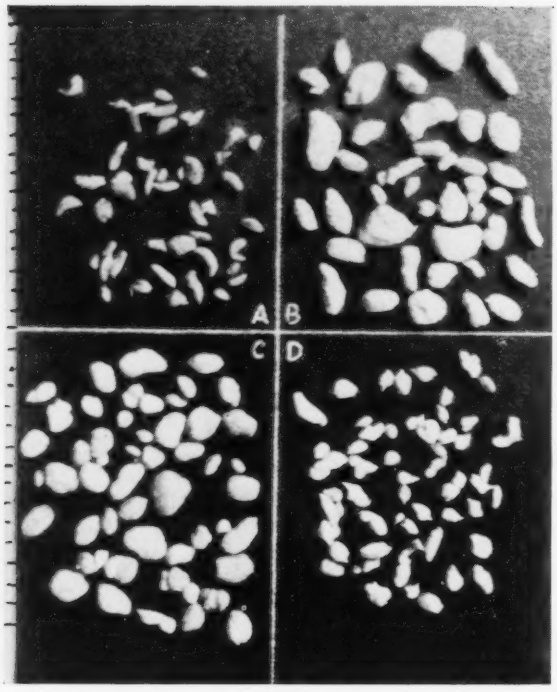


Fig. 2. Maternal cotyledons dissected from the uterus to show the relationship between number and size of cotyledons on one hand and the stage of pregnancy on the other. (All cotyledons were photographed.) A. Cotyledons from gravid horn during recent pregnancy (Stage P. II), non-gravid horn had no cotyledons (No. 13). B. Cotyledons from gravid horn during early pregnancy (Stage P. III), other horn was blocked and contained no conceptus (No. 10). C & D. Cotyledons from gravid (C) and non-gravid horns at a similar age of pregnancy as B. (No. 11)—Note the surface area is nearly the same in C + D as in B, although the diameter of cotyledons is smaller in C and D than in B. Scale = cm.

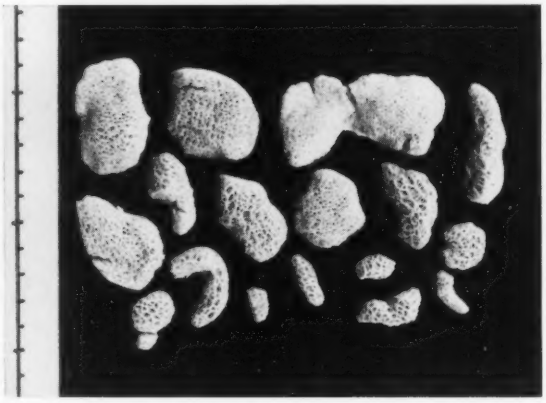


Fig. 3. The morphology of the maternal cotyledons. Cotyledons dissected from gravid and non-gravid horns during early and mid-pregnancy. Scale = cm.

VOL.
35
1954

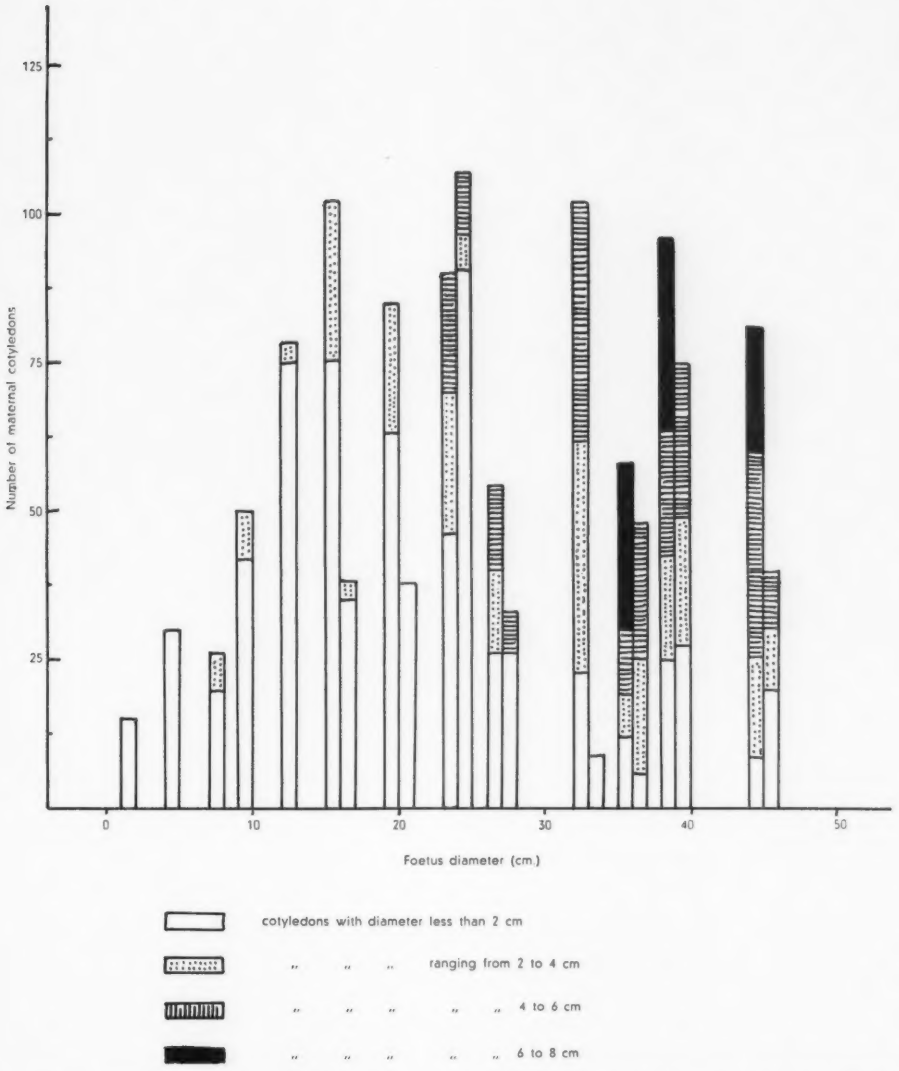


Fig. 4. The number and diameter of maternal cotyledons in the gravid and non-gravid uterine horns during pregnancy in the buffalo. Each animal is represented by two columns; the left (higher) one represents the cotyledons in the gravid horn while the right column (lower) represents these in the non-gravid horn. During recent and very early pregnancy (foetus diameter up to 12 cm) the cotyledons have not yet developed in the non-gravid horn, such cases are represented by a single column for the cotyledons of the gravid horn.

1. Maternal cotyledons developed in number in the gravid horn much earlier than in the non-gravid, they developed in the latter when the foetus diameter was some 15 cm.

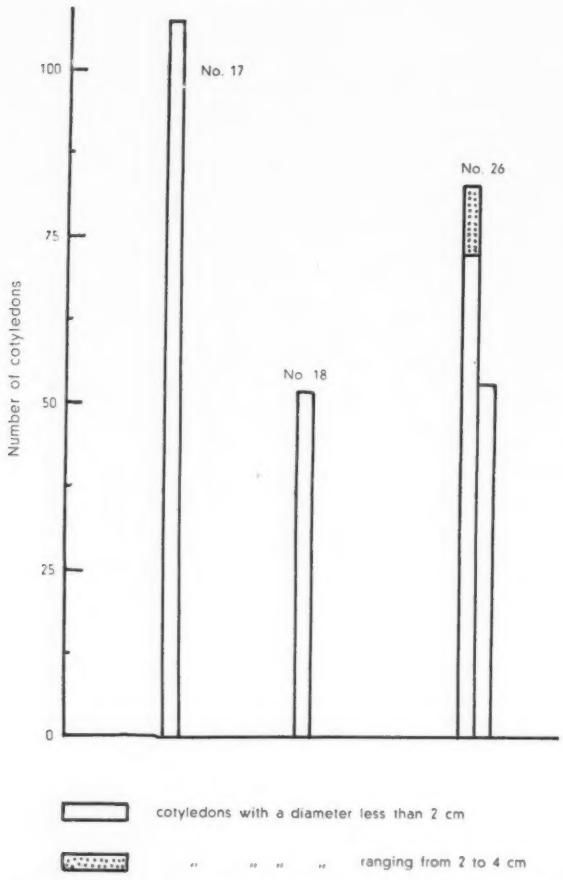


Fig. 5. Individual differences in the number and distribution of maternal cotyledons in the gravid and non-gravid horns. This is represented by cotyledons of three buffaloes with the nearly same age of pregnancy (foetus diameter ranging from 12.1 to 13.8 cm and foetus weight varying from 325 to 360 gm).

2. The cotyledons started to develop in the non-gravid horn when their number in the gravid horn reached its maximum (foetus diameter 15 cm).
3. There was no fixed ratio between the total number of cotyledons in the gravid and the non-gravid horns, in one case, the number in non-gravid was bigger than that in the gravid. (See at foetus diameter 25 cm.)
4. There was a trend of decrease in the cotyledons number towards and after mid pregnancy.

Figure 5, however, shows individual differences in the number and distributions of maternal cotyledons in the gravid and non-gravid horns at the same stage of pregnancy. In buffaloes no. 17 and 18 there were no cotyledons in

VOL. 35 1954

Table 2. *The number and diameter of maternal cotyledons in the gravid and non-gravid horns.*

Phase of pregnancy	Number				Diameter (cm)			
	Gravid		Non-gravid		Gravid		Non-gravid	
	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range	Mean
P. I	Nil	—	Nil	—	—	—	—	—
P. II	0— 50	31.4[1]	0— 65	10.6[1]	0.2—2.5	1.2[1]	0.1—0.4	0.2[1]
P. III	52—110	73.2	0— 53	12.9[2]	0.5—3.1	2.1	0.4—1.0	0.7
P. IV	79—102	89.0	38—107	51.5	0.5—5.1	3.1	0.5—5.0	1.2
P. V	50—102	66.8	9— 48	28.1	1.1—9.1	5.2	0.3—3.3	2.3
P. VI	82— 96	89.0	40— 75	57.5	1.2—8.2	6.1	0.9—5.1	3.1

Table 3. *The weight of maternal cotyledons in the gravid and non-gravid horns.*

Stage of pregnancy	Total wt. of cotyledons (gm)				Average wt. of one[3] cotyledon (gm)	
	Gravid		Non-gravid			
	Range	Mean	Range	Mean	Gravid	Non-gravid
P. I	Nil		Nil		Nil	Nil
P. II	4— 5	4.5	0— 4	1.8	0.14	0.17
P. III	6— 28	20.3	0— 11	4.2	0.28	0.33
P. IV	56— 87	71.5	8— 51	20.1	0.80	0.39
P. V	152—270	231.0	21—111	54.3	3.46	1.93
P. VI	316—410	363.0	47— 91	69.0	4.08	1.20

Table 4. *The weight of uterine horns (including the maternal cotyledons) and the weight ratio of maternal cotyledons to uterine horns.*

Stage of pregnancy	Wt. of uterine horn (gm)				Wt. of cotyledons x 100[5] Wt. of uterine horn	
	Gravid		Non-gravid			
	Range	Mean	Range	Mean	Gravid %	Non-gravid %
P. I	190— 400	300	180—370	278	00	00
P. II	198— 320	264	197—310	235	1.70	0.77
P. III	300— 610[4]	393	187—450[4]	282	5.17	1.49
P. IV	622—1 330	876	310—840	578	8.16	3.48
P. V	870—1 306	1 144	376—800	519	20.19	10.46
P. VI	840—1 330	1 083	700—730	717	33.52	9.62

[1] Cases where the placentomes were not developed, were excluded from the mean.
[2] In one case the non-gravid horn was blocked, the placentomes being only in the gravid horn, this was excluded from the mean.
[3] The average number of cotyledon was derived from Table 2.
[4] I one case the non-gravid horn was blocked, this was excluded.
[5] The average wt. of cotyledons was derived from Table 3.

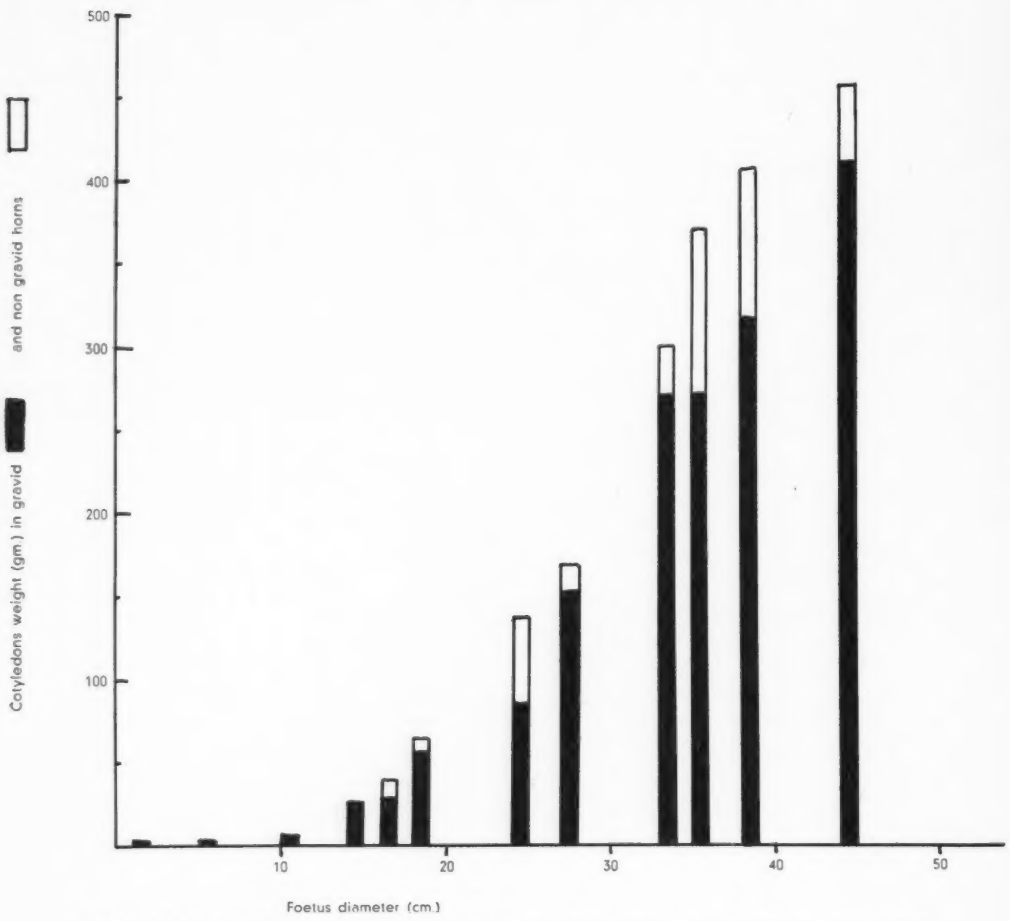


Fig. 6. The weight of maternal cotyledons in the gravid and non-gravid horn during pregnancy. Each animal is represented with one column.

the non-gravid horn while in no. 26, large number of cotyledons developed in both horns.

In the gravid horn the total weight of maternal cotyledons ranged from 4.5 gm in stage "P. II" to 363.0 in stage "P. VI". Each cotyledon weighed on an average from 0.14 gm in stage "P. II" to 4.08 gm in stage "P. VI". In the non-gravid horn, the total weight of cotyledons ranged from 1.8 gm in stage "P. II" to 69.0 gm in stage "P. VI". The average weight of one cotyledon ranged from 0.17 to 1.20 gm (Table 3). The total weight of cotyledons in the gravid horn was higher than that in the non-gravid, sometimes as much as 530 %. Figure 6 shows the progressive increase in the total weight of maternal

VOL. 35 1954

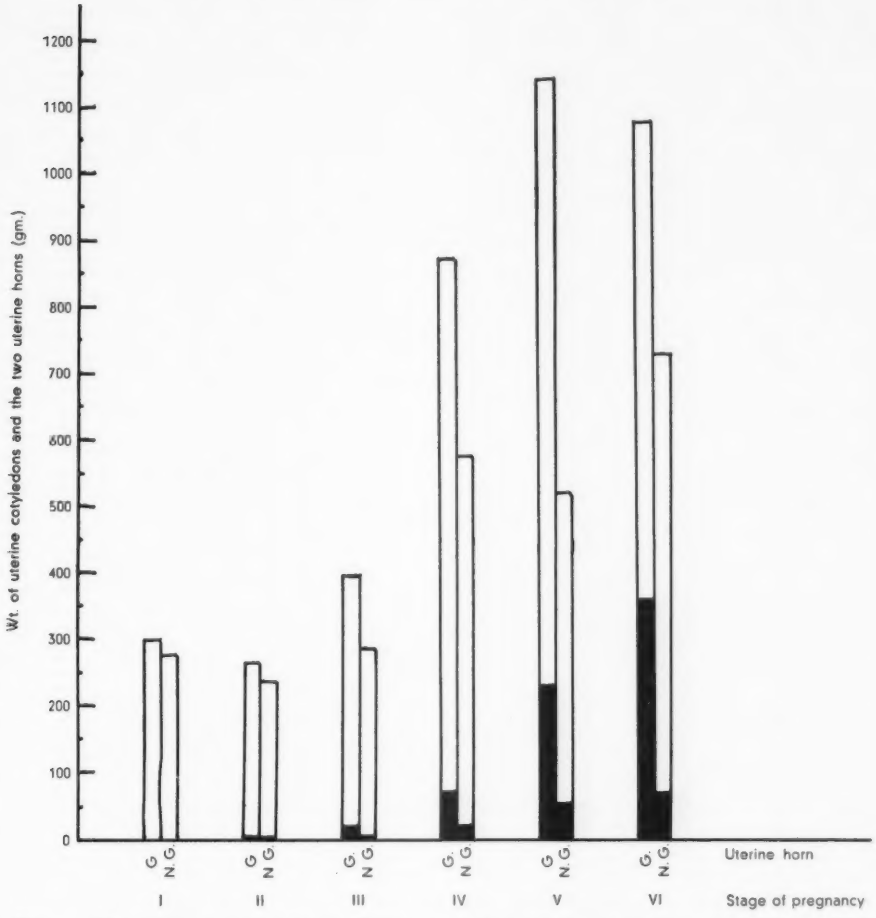


Fig. 7. The average weight of maternal cotyledons and uterine horn in the gravid and non-gravid sides during the six stages of pregnancy (P. I—P. VI). Each case is represented by two columns, the left represents the gravid (G.) and the right represents the non-gravid (N.G.). The black columns represent the weight of cotyledons whilst the white ones represent the uterine weight.

cotyledons in both horns with the advancing pregnancy. The increase in weight of cotyledons is more pronounced in the gravid than in the non-gravid horn.

During recent stages of pregnancy (P. I & P. II) each uterine horn weighed some 230 gm on an average with no significant difference between the weight of the gravid and non-gravid. From stage "P. III" onwards the weight of the gravid horn was significantly higher than the non-gravid of the corresponding age of pregnancy. At stage "P. VI" the average weight of gravid horn was 1083 gm while the non-gravid was some 717 gm (Table 4). The weight ratio of maternal cotyledons to uterine horn ranged from 1.8 to 33 % in the gravid

horn and from 0.8 to 10 % in the non-gravid horn. Figure 7 shows the accelerating increase in the weight of both the uterine walls and their cotyledon contents, the increase being more pronounced in the gravid side than in the non-gravid.

DISCUSSION.

Confusion of nomenclature has arisen in the literature of cotyledonary placentation. *Caruncles* are permanent elevations in the ruminant uterus (except the camel), they are formed early in the foetal uterus and persist throughout life unless destroyed pathologicaly. During pregnancy, these caruncles form functional units with localised villous proliferation from the chorionic membrane. *Placentome* is appropriately used to designate the composite structure of both the foetal and maternal attachment.

The cotyledonary placentation or multiplex is characterised independently of pregnancy by numerous endometrial caruncles. Amongst Ruminants there seem to be species differences in the number of cotyledonary burrs in the non-pregnant endometrium. There are also individual differences in this number, this may be due to age factors or to the number of previous parturitions. It is not known whether the number of the endometrial caruncles is correlated with the reproductive poteniality of the animal. The height of these caruncles is correlated with the phase of the oestrous cycle, this is due to the hormonal influence. The time relationship between the follicular and luteal phase is still unknown in the buffalo. In this species, the uterine mucosa is never observed pigmented. In other species, however, such as the ewe, the endometrium is pigmented due to the presence of melanoblasts similar to that found in the skin.

With the onset of pregnancy, certain morphological and histological changes take place in the maternal cotyledons and in the intercotyledonary areas to ensure implantation and foetal attachment. During early pregnancy, the chorionic villi start to develop near the middle of the allanto—chorion—sac opposite the dorsum of the foetus. This occurs when the foetal membrances reach their maximum length and when the foetal fluids start to accumulate. The foetal villi then grow into the maternal tissue. Whether this takes place mechanically or by a phygocytic action is not known. The maternal cotyledons become spongy and hypertrophied around the foetal villi due to the infilteration of lymph between the more superficial cells and subepithelial layer.

In the cow, adventitious cotyledons are formed in the intercotyledonary region as outgrowths of the subepithelial connective tissue at and after the 4th months of pregnancy (Hammond, 1927). Free villi in the intercotyledonary areas are also present in other species, being more prominent in the ewe than in the cow. They act as centres of absorption of materials elaborated by the uterine glands (Assheton, 1906). The presence of adventitious cotyledons or of free

VOL. 35 1954

villi in the intercotyledonary area in the pregnant endometrium of the buffalo is still unknown from this investigation since the experimental material did not include late stages of pregnancy.

The number, diameter and weight of maternal cotyledons are always in excess in the gravid horn than in the non-gravid, this is mainly to facilitate the direct supply of nutrients to the foetus. Also the largest cotyledons within the gravid horn are observed around the dorsum of the foetus. These thickened areas in the placenta around the foetus gives more protection for this type of intra-uterine pregnancy. The surface area ofall the maternal cotyledons is correlated with the stage of pregnancy. As the foetus increases in weight and length, the total surface area of the maternal cotyledons increases, this is achieved through increasing the diameter of each single cotyledons rather than increasing the number of cotyledons.

There is individual difference in the weight of maternal cotyledons at the same stage of pregnancy (see Fig. 5). It is of great academic interest in placental physiology to find out how far the growth rate of the maternal cotyledons is correlated with that of the foetus. It should be mentioned here that the weight increase in the uterine horn during pregnancy is mainly due to the increase in the maternal cotyledons as shwon from the percentage weight of latter to the former (see Table 4). It is also possible that the uterine walls (apart from the maternal cotyledons) undergo certain growth or developmental changes with the advancing pregnancy and with the successive pregnancies.

The buffalo which is a uniparous species, resembles other similar species in the presences of placentomes even near to the cervix (see Fig. 1). In multiparous species, however, such as the sow and doe, the placenta is never in contact with the cervix. Further investigation are needed for the comparative anatomy of placentomes in Ruminants. It is of great interest to correlate such differences in the placentomes and the evolutionary scale of these animals.

SUMMARY.

1. Genitalia from fifty pregnant (recent, early & mid-pregnancy) and twenty-four non-pregnant buffaloes were dissected. Shape, size, weight, number and distribution of placentomes were recorded in the gravid and non-gravid horns.
2. During non-pregnancy, the uterus contained from 90 to 180 caruncles in linear arrangement. The height of the caruncles varied with the phase of the oestrous cycle.
3. The number of maternal cotyledons during pregnancy was about 100 in the gravid horn and 50 in the non-gravid. The cotyledons developed at first near the dorsum of the foetus where the foetal fluids started to accumalate.

4. The diameter of the maternal cotyledons varied with the stage of pregnancy and the position inside the uterus.
5. The maximum number of cotyledons was achieved in early stages of pregnancy while the maximum diameter was not reached until very late pregnancy.
6. The total weight of maternal cotyledons in both horns during mid-pregnancy was some 500 gm, it was four times heavier in the gravid horn than in the non-gravid.
7. The average weight of each uterine horn during non-pregnancy was 300 gm. By mid-pregnancy, the gravid horn weighed over 1000 gm and the non-gravid some 700 gm.
8. The weight ratio of maternal cotyledons to uterine horn reached by mid-pregnancy 34 % in the gravid side and 10 % in the non-gravid.

ACKNOWLEDGEMENTS.

The experimental material were supplied from Cairo Central Slaughter House while the work was carried out at the Animal Breeding Laboratory, Faculty of Agriculture. Thanks are due to the staff of the Slaughter House and to Mr. I. FOUAD for photographic assistance.

VOL. 35 1954

LITERATURE CITED.

AMROSO, E. C. 1952. Placentation, Capter 15, In *Marshall's Physiology of Reproduction,* Edited by A. S. Parkes, Vol. II, Longmans, London, p. 125.

ASSHETON, R. 1906. The morphology of the ungulate placenta particularily the development of that organ in the sheep and notes upon the placenta of the elephant and hyrax. Philos, Trans., B, *198,* 143.

BARCROFT, J. 1946. *Researches on Prenatal life.* Oxford.

— ELLIOTT, E. H. E., FLEXENER, L. B., HALL, F. G., HERKEL, W., MCCARTHY, E. F., MCCLURKIN, T. & TALATT, M. 1934. Conditions of foetal respiration in the goat. J. Physiol., *83,* 192.

CLOETTE, J. H. L. 1939. Prenatal growth in Merino sheep. Onderstepoort J. Vet. Sci., *13,* 417.

CRAIG, J. F. 1930. *Fleming Veterinary Obstetrics,* 4th Ed., London.

ELLENBERGER, W. & BAUM, H. 1921. *Handbuch der Vergleichenden Anatomie der Haustiere.* Berlin.

ELLIOTT, R. H., HALL, F. G. & HUGGETT, A. St. G. 1934. The blood volume and oxygen capacity of the foetal blood in the goat, J. Physiol. *82,* 160.

GRANT, R. 1933. The pigmentation of the uterine mucosa in the ewe. Vet. J., *89,* 271.

HAFEZ, E. S. E. 1952. The Buffalo (A review). Ind. J. Vet. Sci. & Anim. Husb. *22,* 257.

— 1954. The Placentations of Camels and Buffaloes (In preparation for publication).

HAFEZ, E. S. E. 1954. Foetal-Maternal attachments in the buffaloe and camel, Experientia [Basel] (In the Press).

HAMMOND, J. 1927. *The Physiology of Reproduction in the Cow,* Cambridge, the University Press.

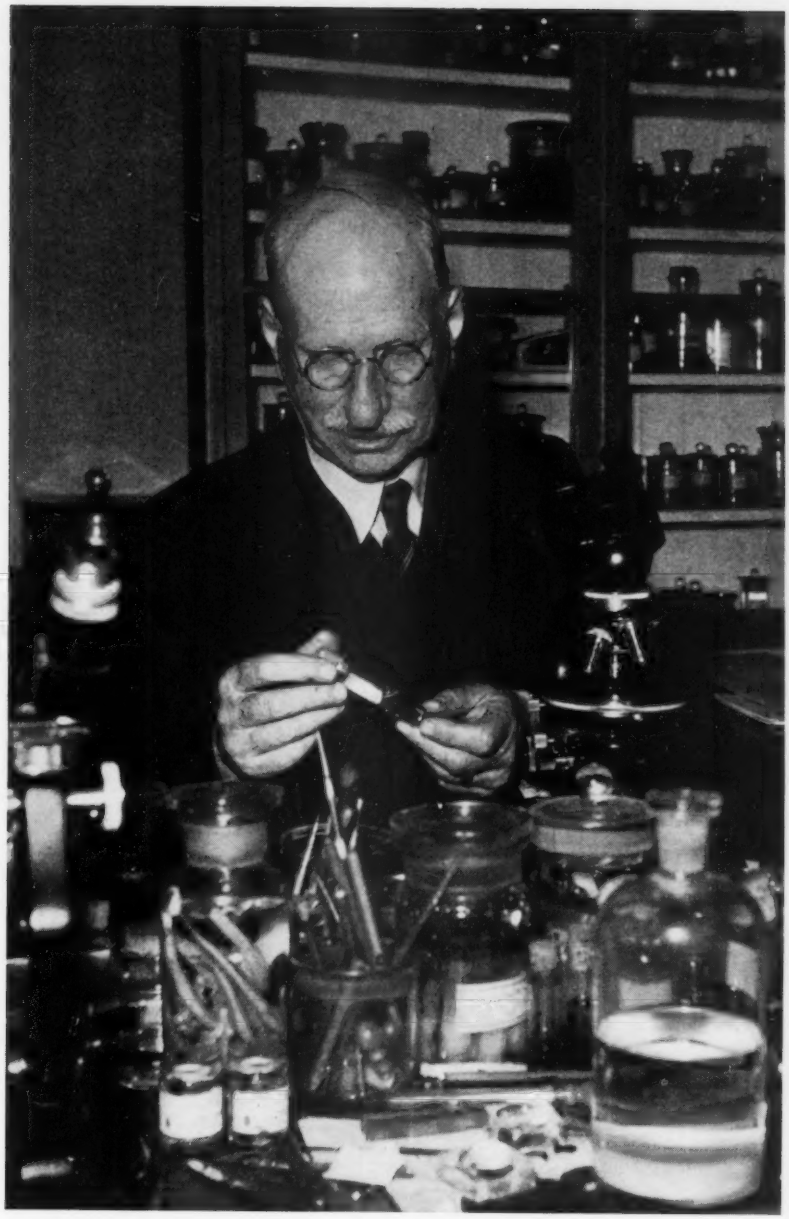
RORIK, H. H. 1907. Berechnung der Oberflache der Uteruskarunkeln (Seniplacenta materna) beim Rind. Arch. wiss prakt. Tierheilk., *33,* 421.

SOMMER, M. 1912. Beitrag zur Kenntnis der Involution des normalen Uterus des Rindes. Z. Tiermed., *16,* 235.

STRAHL, H. 1912. Zur Kenntnis der Wiederkauer placentome. Anat. Anz. *40,* 257.

L.
5
54

VOL.
35
1954



NILS HOLMGREN

1877—1954.

VOL.
35
1954

We regret to announce the death on September 7 this year of the chief editor and founder of "Acta Zoologica", Professor Nils Holmgren.

Nils Holmgren was born in 1877 and his death was the end of a life long career devoted solely to zoology. His first paper dealing with the bursa copulatrix in elaterids he published (in Swedish) as a young student in 1898, and his last, just finished when illness took him away from his laboratory, will be published in this journal next year.

For almost 20 years he devoted his work to the study of insects. Partly as a result of an expedition to South America in 1904—1905 the termites caught his interest, and in the 27 papers he published on that subject he developed into a prominent expert on the taxonomy of that insect group.

In 1917, after having published about 50 papers on arthropod anatomy and termite systematics he turned his interest to lower vertebrates, especially fishes, where he was going to do most of his future research work. At this time, 1919, he was appointed to the Chair of Zoology in Stockholm. His first papers on vertebrate anatomy dealt chiefly with the epiphysis and the parietal organ in fishes and amphibians, followed by a series of researches on brain morphology of lower vertebrates.

During the last 20 years his main interest was divided between the study of the ontogeny and the anatomy of the head of fishes and the origin of the tetrapod limb on which subjects he published a long series of papers. In the meantime he also described two young embryos of Myxine, the only ones ever found, and

wrote a study on the pronephros and the blood in the hagfish. His last paper deals with hand, foot and pelvis in birds.

During his long life he collected an enormous stock of very reliable knowledge in all fields of anatomy. In connection with his natural gift for fresh suggestions and combinations it formed a most valuable asset for his pupils and colleagues. His own work followed phylogenetical trends.

After the first world war he wanted to make an attempt towards reconciliating scientists from formerly hostile countries by offering a neutral meeting-place. It was in that spirit he founded, in 1920, Acta Zoologica as an international journal open to zoologists of all nations. During almost 25 years he carried alone the responsibility and anxiety connected with the editorship.

T. P.

VOL.
35
1954

ON THE PHYLOGENY OF THE PYCNOGONIDA

BY

JOEL W. HEDGPETH

(Scripps Institution of Oceanography.*)

Essentia non sunt multiplicanda praeter necessitatem. William of Occam ... The only fact of cosmic significance in the whole subject of evolution in its broadest sense is the appearance of the single cell. A. H. Clark, *Zoogenesis*, p. 216.

CONTENTS.

1. The Classification of Fossil "Pantopoda" 193
2. On some Recent Flights of Phylogeny 203
Summary 211
References 211

L.
5
54

1. THE CLASSIFICATION OF FOSSIL "PANTOPODA".

The pycnogonids are a group of curious marine arthropods of uncertain phylogenetic affiliations, remarkably uniform in certain basic structural characteristics. These are the "proboscis", a large, tripartite structure of one, or rarely two joints (when two jointed, the articulation is evidently a secondary modification), a reduced abdomen which is little more than a tubercle upon which the anus is situated, the absence of a well defined trunk or body, and legs composed of three short proximal or "coxal" joints, a long femur, two long tibial joints, a "tarsus and propodus" (actually a basitarsus and tarsus), in all, eight joints, and usually a large terminal claw, the dactylus or "transtarsus" of HANSEN. This is the extreme of reduction, found only in the females of a few genera; the males of these have en additional pair of appendages, the ovigers. The ovigers, actually the third pair of appendages, are present in both sexes of most forms.[1] The development of intratarsal muscles in the terminal segments of the ovigers is a feature not found in any other arthropods (SNODGRASS, 1952). Two other pairs of appendages are found in some families and genera, the chelifores (which may often be achelate in the adult and in some species are deciduous), and the palpi. Classification within

* Contribution of the Scripps Institution of Oceanography New Series No. 701.

[1] The pycnogonids are usually characterized as having separate sexes; DUBOIS REYMOND MARCUS (1952) has described a hermaphroditic species, and it must be confessed that the great majority of species have not been too carefully examined, so hermaphroditism may be more widespread. Perhaps the curious business of transport and nursing of eggs by the male may have had its origin in a primitively hermaphroditic condition.

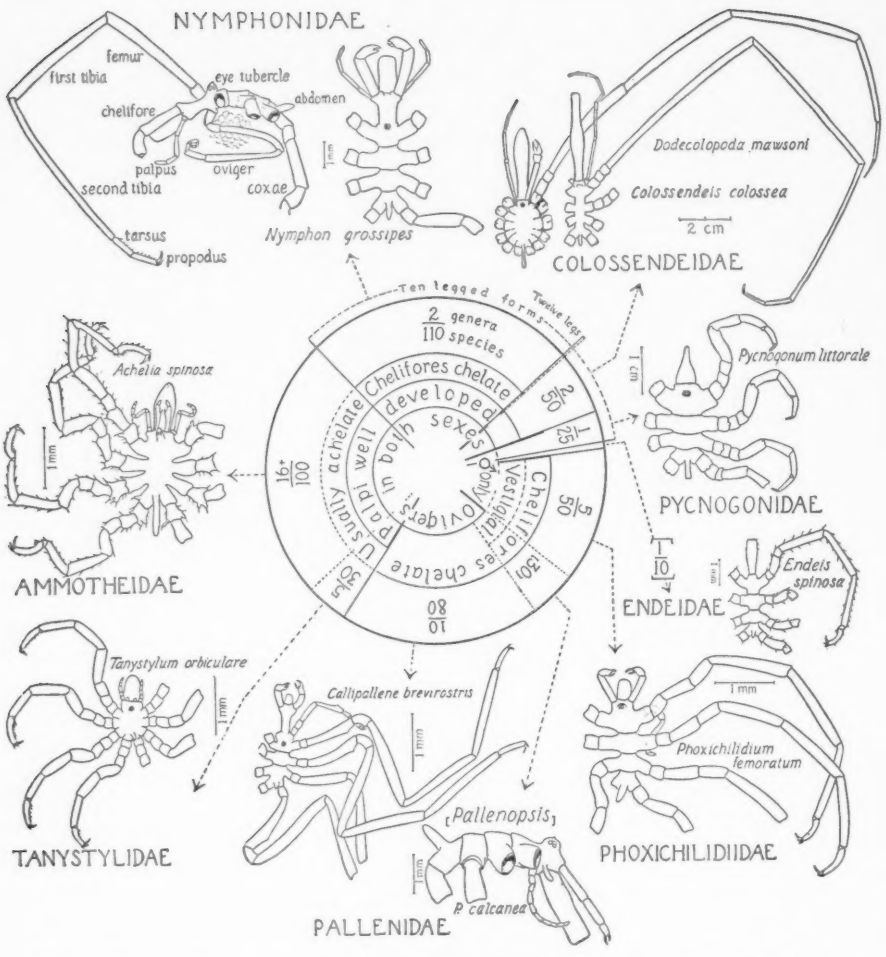


Fig. 1. The families of Pycnogonida, showing the characters on which classification is based. (From Hedgpeth, 1947.)

the Pycnogonida is based primarily on the combinations of these three anterior pairs of appendages, and there are so many transitional forms that family divisions are not always clear and orders cannot be recognized (fig. 1).

The pycnogons (as many English zoologists call them) have no free swimming larval stage; in those forms for which the life cycle is known, the protonymphon larva (fig. 2), a curious six appendaged form reminiscent of the crustacean nauplius but more specialized than that larval form, works its way into a hydroid or other coelenterate, where it may form a gall, or into a mollusk or holothurian, and spends the early part of its life as a parasite, or at best a probably irritating commensal.

VOL. 35 1954

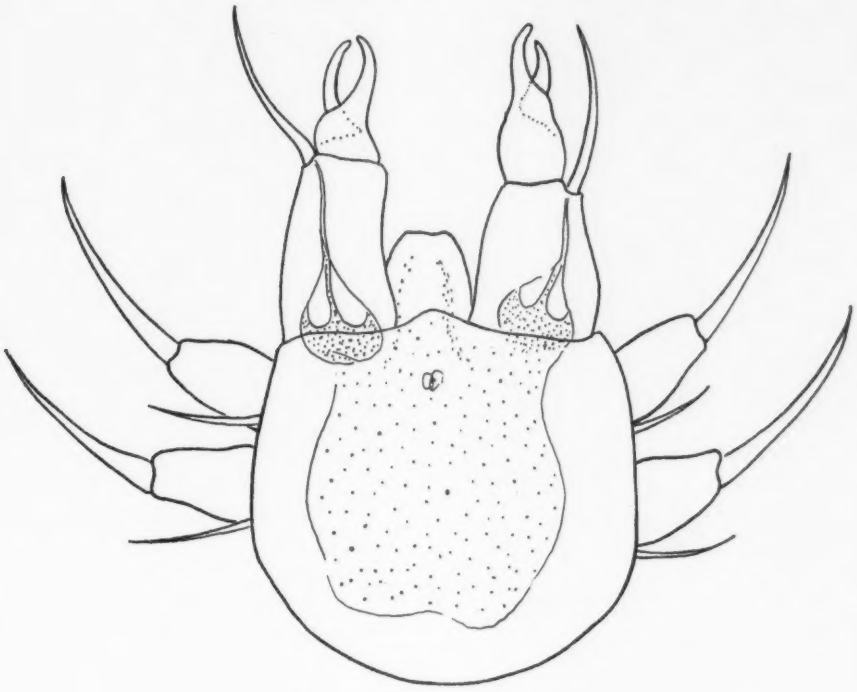


Fig. 2. A protonymphon larva.

If we examine the developing pycnogonid as well as the various types of adults, we find the following constellation of generalized characters:

1. The chelae are well developed, and comparatively large.
2. The palpi have at least 5 segments.
3. The ovigers are present in both sexes.
4. There are four pairs of walking legs, ending in a simple terminal claw or dactylus.
5. The proboscis is small, short and cylindrical, rather than long, pyriform or styliform.
6. There is no trace of an excretory system, but there is a secretory gland associated with the first appendage of the larva, and the male bears cement glands in the femoral segments of the legs.
7. There is no respiratory system.
8. In general, there are few spines, processes or tubercles on the legs and trunk, and prominent genital and cement gland tubercles are not developed.

These characters are essentially those of the family Nymphonidae, and to a lesser extent, of the Colossendeidae (disregarding the deciduous nature of the chelae in this family). At the other extreme we find the Ammotheidae,

which, although possessing well developed palpi and, in some cases, chelate chelifores, exhibit the greatest development of spines, tubercles and processes. A curious and unique aspect of the Pycnogonida is the occurrence in certain families of extra trunk somites, bearing fully developed legs. Among the Nymphonidae there are at least two such ten-legged forms, and in the Colossendeidae there are several, together with one (*Dodecolopoda*), in which there are two extra somites. Such pentameric forms are also found among the Pycnogonidae, which show the extreme in reduction of anterior appendages in the group. As previously pointed out (HEDGPETH, 1947), the one aspect shared in common by these polymeric forms is a high ratio of species per genus in the families in which they occur, whereas in such families as the Ammotheidae and Pallenidae there are a large number of forms recognized as genera, with comparatively few species per genus. My suggestion that these polymerous forms may represent polymorphic species, perhaps induced by a polyploidic condition, still awaits more tangible evidence. If we regard them as examples of metameric instability, the question arises as to the possible body region in which this instability occurs. On the basis of the smaller second trunk somite and walking legs of *Pentacolossendeis* it was suggested that this instability occurred near the anterior end (HEDGPETH, 1947). This is similar to the suggestion that the intercalary rings of Notostraca are a result of a forward shifting of the growth axis (LINDER, 1945). A phenomenon of this character, associated with the production of appendages, as in the pycnogonids, might account for such apparently anomalous structures as the ovigers. Certainly the evidence for intercalary somites is stronger in the Pycnogonida than in any other group of arthropods.

VOL.
35
1954

In the past, the Pycnogonida (or Pantopoda, as they are called where Latreille's name is not conceded priority), have been most often classified somewhat vaguely with the Arachnida, or as an appendix to this class, or as a division of the Arachnoidea, an amorphous grab-bag of oddities perpetually offered to the innocent student in elementary textbooks and field manuals. Of late, the Pycnogonida have been considered to be of chelicerate stock, usually as a class of equal rank with the Arachnida and Xiphosura (to mention only the living), although they have such features as multiple genital openings and the oviger, which do not occur in the chelicerates.

Although often abundant, especially in colder seas, these animals, with their thin chitinous integument, are poor candidates for fossilization, and no fossils surely referable to the Pycnogonida, as characterized above, are known. Some years ago F. Broili described some strange arthropods from the Hunsrück shales of the Lower Devonian which he ascribed to the Pycnogonida, and although this has been received with reservation by active students of the living pycnogonids (CALMAN & GORDON, 1933; HEDGPETH, 1947; FAGE, 1949),

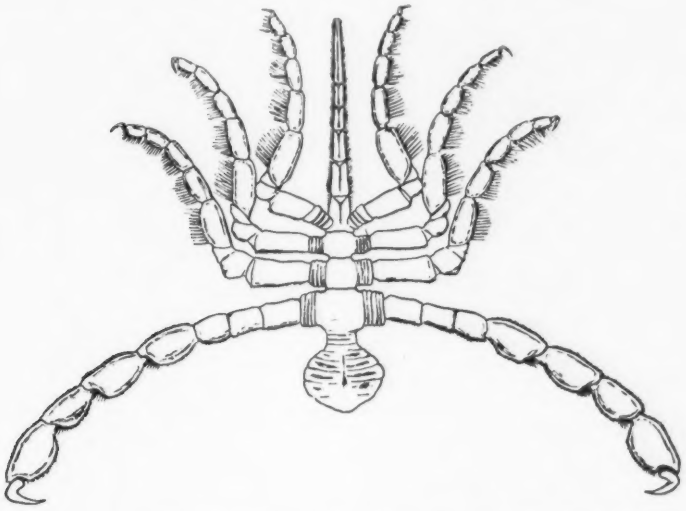


Fig. 3. The suggested restoration of *Palaeoisopus problematicus* according to Broili (1933).

and somewhat less skeptically by Marcus (1940), the attribution has been accepted without question by Petrunkevitch (1952 a) and Størmer (1944).

The fossil now known as *Palaeoisopus problematicus* was considered an isopod by Broili (1928) when he first described it. A year later he described another find from the same formation, to which he gave the name *Palaeopantopus maucheri* (Broili, 1929). This fossil looks much more like a living pycnogonid than *Palaeoisopus,* and was unhesitatingly referred to the Pantopoda, and on the occasion of describing another specimen a year later, Broili (1930) set up the "group" Palaeopantopoda. Two years later Broili (1932) decided that *Palaeoisopus* was also a pycnogonid and in the following year (1933) published his final paper on this strange form, with palaeoecological inferences from the four known specimens. These inferences culminated in an imaginative drawing of *Palaeoisopus* swimming gracefully with its paddle like legs among a colony of stalked crinoids.

Palaeoisopus (fig. 3) was a large creature (about 20 cm span across the last pair of legs), with four pairs of appendages, the last pair paddle-like, a long anterior processes composed of perhaps five parts or segments, and a bulbous, apparently segmented, abdomen. The first three pairs of appendages are apparently 8-jointed, the last 7-jointed; all the legs terminate in hook-like claws. There is no well developed body, thus suggesting the usual form of a pycnogonid, and the cephalic segment seems to be the smallest. A most curious feature, which *Palaeisopus* shares with *Palaeopantopus,* is the formation of ring-like markings or structures on the lateral extensions of the body somites. These markings are apparent in only one leg of another nearly com-

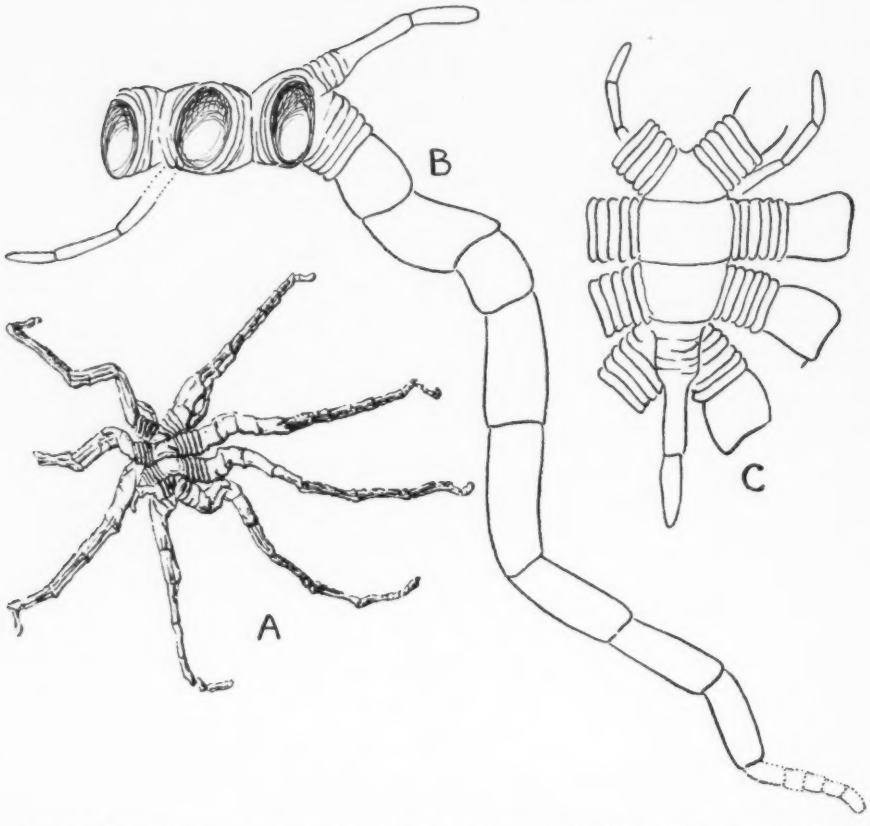


Fig. 4. *Palaeopantopus maucheri*. A, sketch of the fossil (from Broili, 1929). B., C., suggested reconstruction (original).

plete fossil (Broili, 1933). They are, however, very conspicuous in *Palaeopantopus*. At any rate, this ring-like structure is actually the only external feature, aside from the general reduction of the body to a pycnogonid-like aspect, that these two fossils share in common.

In *Palaeopantopus* (fig. 4), there seem to be at least 9 joints in the legs, with suggestions of small terminal joints reminiscent of an insect leg. In both the described specimens there is no trace of a proboscis, but there are suggestions of a 2- or 3- jointed abdomen and a pair of small anterior appendages whose position suggests ovigers although they look more like the palpi of existing pycnogonids.

Neither of these fossils resembles any other known fossil or recent arthropod very closely. There is a superficial resemblance between *Palaeoisopus* and the isopods of the genus *Pleurogonium* which have a bulbous pleotelson and rather well separated lateral processes, but the anterior part of *Pleurogonium* is

VOL. 35 1954

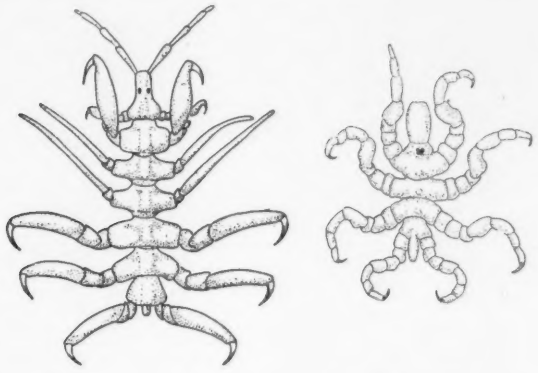


Fig. 5. *Paracyamus* and *Pycnogonum* (approximately same scale).

typically isopodan in appearance. The last pair of appendages of *Palaeoisopus* resemble the enlarged peraeopods of *Munnopsis*, another specialized isopod. These are only coincidental resemblances, somewhat like the superficial similarities between the whale-louse *Cyamus* and *Pycnogonum*, which caused some confusion in Linnaean times, Linnaeus in fact called the common shore pycnogonid of Europe *Pycnogonum balaenarum*, evidently under the impression that *Cyamus* and *Pycnogonum* were the same thing (fig. 5). Such superficial resemblances reach fantastic extremes in insects and spiders, but have little if any bearing on phylogenetic relationships.

This strange *Palaeoisopus* is a fascinating object, with its jointed anterior process and bulbous posterior. BROILI discerned no less than five segments in this proboscis, the second of which he counted as the first trunk segment. If we are to accept this interpretation, the last pair of legs falls in the ninth somite, in agreement with the serial homologies of CARPENTER, WIRÉN and HENRY (Table 1). This, of course, does not prove anything, and confronts us with the difficulty of homologizing several apparently cylindrical somites with those bearing the chelifores, palpi, and ovigers of the living pycnogonids. If we are to take this at face value, this anterior nozzle-like structure of this Lower Devonian fossil represents a high degree of specialization.[2] The posterior end of the fossil poses some more difficulties: as PETRUNKEVITCH (1952 b) has pointed out, the loss of abdominal segments is one of the most important evolutionary trends in the Arthropoda. In the living Pycnogonida this reduction has reached an end point: the abdomen is nothing more than a tubercle with a distal anus, although in a few species in may be rather long

[2] While it is true, as HANSEN (1930, p. 107) says, that "a segment of the body in an Arthropod is in its simplest form a ring chitinized on all sides", the examples he gives are of posterior segments; an anterior segment should also have a pair of appendages or at least a basic sensory structure. To be an Arthropod at all, the appendage would have to consist of at least two segments with an intervening joint. (See PRYOR, 1951, for a theory of the origin of jointed appendages from tubular processes.)

Tab. 1. *A Half-century of homologies.*

	Carpenter, 1905			Wirén, 1918			Fage, 1949			Ferris & Henry, 1949—53		
Somite	Pyc.	Xiph.	Arach.	Pyc.	Xiph.	Arach.	Pyc.	Xiph.	Arach.	Pyc.	Xiph.	Arach.
		M O U T H			*M O U T H*							
1	eyes	eyes	eyes	dorsal antimere	rostrum	rostrum	Chelifores & dorsal antimere	Chelicera	Chelicera & labrum	proboscis	rostrum	labrum
							M O U T H					
2	—	—	rostrum	chelifores	chelicera	chelicera	palpi & ventral antimeres (*ovigers*)*	1st leg	pedipalps	base of proboscis	base of rostrum	[absent]
3	chelifores	chelicera	chelicera	"pedipalp" & ventral antimeres	pedipalps	pedipalps	1st leg	2nd leg	1st leg	chelifores	outer carapace	chelicera
4	palpi	—	—*	palpi	1st leg	1st leg	2nd leg	3rd leg	2nd leg	palpi	pedipalps	pedipalps
5	ovigers	1st leg	pedipalps	oviger	2nd leg	2nd leg	3rd leg	4th leg	3rd leg	ovigers	2nd leg	1st leg
6	1st leg	2nd leg	1st leg	1st leg	3rd leg	3rd leg	4th leg	5th leg	4th leg	1st leg	3rd leg	2nd leg
7	2nd leg	3rd leg	2nd leg	2nd leg	4th leg	4th leg	abdomen	pregenital	[pregenital]	2nd leg	4th leg	3rd leg
8	3rd leg	4th leg	3rd leg	3rd leg	abd. 1	abd. 1		genital	genital	3rd leg	5th leg	4th leg
9	4th leg	5th leg	4th leg	4th leg	genital	genital				4th leg		
10	abdomen	pregenital	[pregenital]	abdomen						abdomen		
11		genital	genital									

*(*non-homologous*)

*Vestigial in *Epeira*
[Items in brackets refer to condition in the scorpion]

VOL. 35 1954

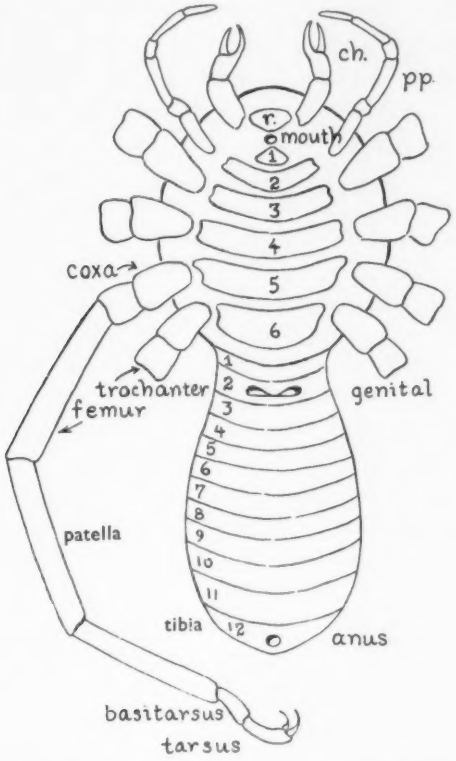


Fig. 6. Hypothetical generalized arachnid, ventral aspect. (original, with the assistance of A. Petrunkevitch).

and spinose. The large abdomen of *Palaeoisopus* is evidently connected to the trunk by a constriction, suggesting again a specialized condition, which if the animal belongs to the chelicerate stock at all, would seem to set it off on a divergent line from the basic arachnid type (fig. 6). A large abdomen suggests the retention of the gonads in the structure, so we cannot say that the Pycnogonida are derived from *Palaeoisopus* by simply pinching off the abdomen at the constriction without somehow getting the gonads through it into the thorax or prosoma, which seems unlikely. In *Limulus,* in which the gonads have anterior branches into the prosoma, the abdomen is broadly joined to the prosoma; if the Pycnogonida have stemmed from some chelicerate stock it is more reasonable to suppose that the gonads have attained their present anterior position by migrating through a similarly broad connection between the abdomen and the prosoma.

In those chelicerates which have been studied in detail, the germ primordia appear very early in development, although the position of the genital openings is remarkably constant (on the second abdominal segment). It is difficult to

see how new genital openings could be developed on all the body somites in response to a forward migration of the gonad from the abdomen. However, the possibility of early development of the gonads in the Pycnogonida might have been associated with an inhibition of the original posterior migration. That is, the gonads might have matured before their migration into the posterior part of the body could take place.[3]

It is possible that the ventral groove suggested in the abdomen by BROILI in his reconstructed *Palaeoisopus* is the genital orifice; if so, it seems to be well back of the second abdominal somite, which PETRUNKEVITCH (1949) considers one of the few good reference points in the anatomy of fossil arachnids. On the basis of the available evidence, therefore, we cannot even place *Palaeoisopus* near the Chelicerata, and if anything is plain about this fossil, it is that it lacks the two pairs of antennae and biramous appendages, so it cannot be a crustacean. All that we can say of it is that *Palaeoisopus* is an Arthropod, *incertae sedis*.

Disposition of the other fossil, *Palaeopantopus*, is not so simple; indeed, there is no valid evidence for excluding it from the modern Pycnogonida although certain essential features are lacking or not apparent. Two specimens have been described, in neither of which is there a suggestion of a proboscis, but in both specimens we can see only the dorsal surface, and the possibility that the creature may have had some sort of proboscideal structure recurved and carried ventrally cannot be dismissed. The absence of eyes and of various anterior appendages means nothing as many living pycnogonids lack these structures. The apparently two or three segmented abdomen cannot be regarded as a character incompatible with the range of variation observed in the existing pycnogonids, as there are some with two pairs of abdominal ganglia. The segmented abdomen might be cited as evidence in support of the suggestion that the gonads migrated into the prosoma early in the history of the group as the abdomen was gradually reduced from the posteriormost somites, narrowed down to little more than a jointed tube. Since PETRUNKEVITCH (1949) has presented evidence that the major chelicerate groups completed their differentiation by Devonian times, the appearance of a pycnogonid-like animal in the Lower Devonian, already well separated from any chelicerate stock, can be accepted with equanimity.

The most logical, although not necessarily natural, disposition of this fossil is to recognize it as the representative of an order, the Palaeopantopoda (BROILI, 1930), and to consider all the existing pycnogonids as belonging to an equivalent category, for which we may use Pantopoda (GERSTAECKER, 1863), retaining Pycnogonida (LATREILLE, 1810) for the class or subphylum

[3] An interesting analogy is the absorption of the germ primordia in Comatulids and the development of the definitive gonad in the axial organ (MORTENSEN, 1920, pp. 68—69). This reminds us, incidentally, that Austin Clark once published a paper titled "The Echinoderms as Aberrant Arthropods" (Smiths. Misc. Colls., vol. 72 no. 11, 1921).

VOL. 35 1954

as a whole. Efforts to fit the Pycnogonida into any schemes with the arachnids or chelicerates should be abandoned, and the meaningless term Arachnoidea should be forgotten. By accepting *Palaeopantopus* as a pycnogonid, we have to recognize that the trend toward reduction of the arthropod abdomen was completed by Devonian times in this peculiar group, and hence the Pycnogonida may be among the oldest of living groups of arthropods.[4]

2. ON SOME RECENT FLIGHTS OF PHYLOGENY.

The amiable pastime of phylogenetic arboriculture seems to be back in favor these days, if indeed it had ever fallen out. The literature of the last fifty years is especially rich in such speculative exercizes, and the Pycnogonida have been one of the favorite subjects of what HANSEN (1925) called "that cheap and easy-going occupation." Probably HANSEN's stern contempt deterred many from venturing into phylogeny, and there have been few serious attempts to place the pycnogonids into a phylogenetic scheme, with formal tables of homologies, since the effort of WIRÉN (1918). At the turn of the century LANKESTER (1904) laid down the law and the prophets, uncritically dumping the Pycnogonia, as the sub-class Pantopoda, into his grade Nomoneristica of the Arachnida, along with *Limulus* and all the rest, with three orders.[5] CARPENTER (1905) also considered the Pycnogonida to be arachnids, and attempted to determine homologies throughout the Arthropoda. He managed to fit the Pycnogonida into his scheme by deciding that that all other arachnids lacked a head segment, the fourth or palpus-bearing somite of the Pycnogonida. WIRÉN (1918) studied the nervous system of several pycnogonids in some detail and endeavored to establish homologies with other arthropods which are somewhat more logical than CARPENTER'S; unlike CARPENTER, he made a serious effort to solve the problem of the proboscis. His suggestion that the latero-ventral antimeres represented the pedipalp somite and that the vestiges of these structures were represented by the teeth at the tip of the proboscis has not been seriously entertained by students of the Pycnogonida. This idea, based in part on faulty observation, was criticized by HANSTRÖM (1919), who denied the segmental nature of the proboscis. The problem of the proboscis has recently been attacked (*inter alia*) by HENRY (1953), again from the viewpoint of the nervous system. She concludes that "it is composed of elements of the first and second body segments; thus it is homologous to the labrum

[4] This contradicts my earlier view (1947) that the Pycnogonida are a relatively new group of arthropods; at that time I had not seriously considered Broili's fossils.

[5] These orders are Nymphonomorpha, Ascorhynchomorpha and Pycnogonomorpha. FAGE (1949) follow's Bouvier's system of four orders, including Cole's Colossendeomorpha. D'Arcy Thompson, in the Cambridge Natural History (1909) seems to have been the first to abandon the attempt to segregate the Pycnogonida into discrete orders, at least in a reference text.

and clypeus of the Crustacea and the Insecta and the rostrum of *Limulus*, and the proboscis of the Polychaeta."

It would seem that HENRY considers the pycnogonid proboscis *directly* homologous to the polychaete proboscis, in brief, little more than an everted and stiffened polychaete proboscis: "It appears that it can be directly homologized with the proboscis of the polychaete worms, which is similar in form. We [i.e., HENRY & G. F. FERRIS] suggest that the sclerotized teeth within the apex of the proboscis are homologous to the teeth or jaws of the polychaetes." HENRY also suggests that the peculiar eye tubercle of the pycnogonid is "homologous with the ocular portion of the prostomium of the polychaete worms." When we add to these statements their observation that the Pycnogonida "to some extent" share the polychaete trait of lacking a fixed number of body segments, it is obvious that FERRIS and HENRY are prepared to place the Pycnogonida closer than any other arthropods to the polychaetes. This is, of course, an idea that has been entertained by other speculative zoologists as far back as DOHRN (1881): "Die Pycnogoniden-Organisation ziegt zwar wenig direkte Beziehungen auch zu Anneliden, aber wenn wir sie in frühere Zustände aufzulösen versuchen, werden wir schliesslich wohl noch zunächst auf Annelidenähnliche Bildungen stossen."

VOL. 35 1954

If we are to consider the pycnogonid and the polychaete proboscis homologous, how are we to explain the fact that one is composed of three longitudinal antimeres and the other is made of two ring-like parts? To be sure, HENRY states only that the jaws of the polychaetes and the denticles of the pycnogonid proboscis are "directly homologous." But it is also considered (HENRY, 1947) that the polychaete proboscis is actually composed of three segments, the first represented by the jaws, the second by the oral ring and the third by the maxillary ring (fig. 7). Yet she finds that the pycnogonid proboscis "is composed of elements of segment one and segment two" (HENRY, 1953, p. 19); segment two, however, is not an integral part of the pycnogonid proboscis but is only "the base . . . which bears the insertion of the muscles which move the proboscis." This seems a rather tenuous extension of the concept of homology; it does not follow that similar structures performing essentially the same function are *ipso facto* homologous. If they are homologous, and the primary indication of such homology resides in the topographic arrangement of the nerves (one of the guiding principles of the FERRIS—HENRY school), where is the polychaete homologue of the median rostral nerve of the pycnogonid? And how do we derive the trefoil arrangement of teeth in the pycnogonid from the paired jaws of the polychaete? To be sound homology, there should be point for point correspondence of the parts involved (cf. REMANE, 1952, ch. 2); this cannot be demonstrated for the proboscides of pycnogonid and polychaete.

We hesitate to beg the question by suggesting that the pycnogonid proboscis

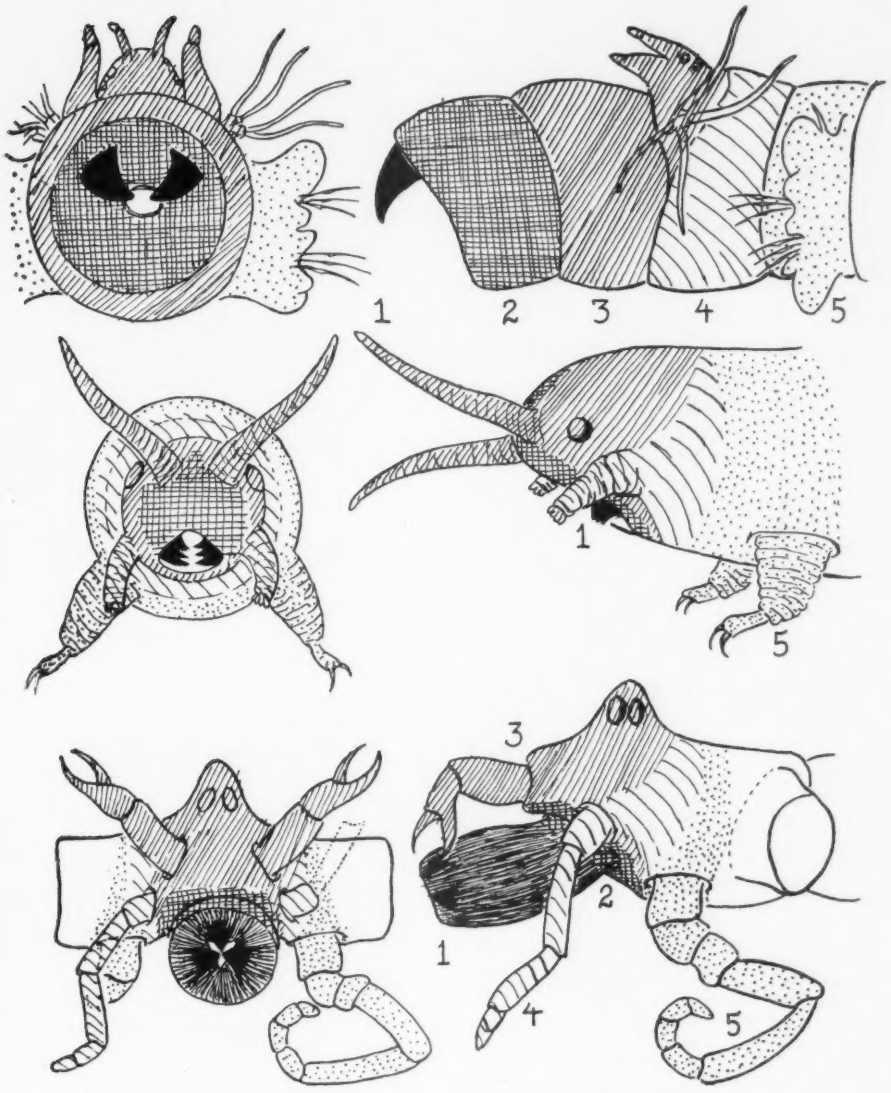


Fig. 7. Anterior ends of a polychaete, onychophoran and pycnogonid, with the segmental homologies according to Ferris and Henry.

may be a secondary structure, without counterpart in any living arthropod (although it bears some superficial resemblance to the sucking apparatus of a tick). Certainly the anterior ganglia and nerve ring are features adapted to meet the need of this instrument, if one may be permitted such a teleological expression. The composite origin of the proboscis is indicated by the origin

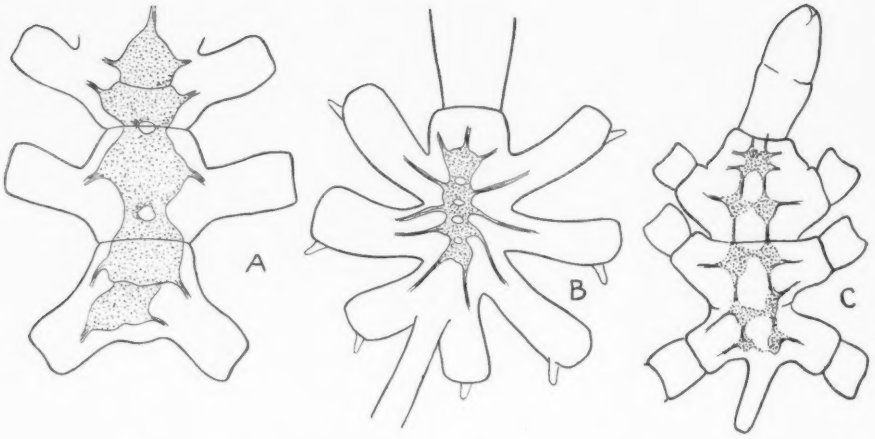


Fig. 8. Distribution of main nerve trunks in various abnormal pycnogonids (From Hedgpeth, 1947).

of the nerves that serve it, although HENRY would have it that the median rostral nerve and the nerves of the lateral antimeres all originate primitively from the stomodeal ganglion. In such genera as *Colossendeis* and *Ascorhynchus* in which the proboscis is more anterior than ventral in position, the rostral nerve arises well toward the median anterior surface of the protocerebrum, while in *Nymphon* and *Anoplodactylus,* which carry the proboscis more ventrally, the origin of this nerve is nearer the base of the protocerebrum, according to HENRY'S drawings. Since the Pycnogonida, like the Arachnida, lack the deutocerebrum, HENRY suggests that the rostral nerve has been carried forward from the tritocerebrum, where it properly belongs since it innervates the stomodeal system, and all stomodeal nerves must come from the tritocerebrum according to her theory. If this is so, why do we not find the rostral nerve much nearer the tritocerebrum in those forms in which the probscis is more ventral than anterior in its position? Can it be that the now-missing deutocerebrum is represented by the anterior ganglia of the proboscis? The conclusions arrived at by HENRY depend in large part on the hypothesis that the nerves of a segmental ganglion do not innervate any organs but those which they originally served in the primitive condition. It is perhaps unfair to cite abnormalities, but the anomolous ditribution of the main nerve trunks in some freak specimens (fig. 8) suggests that this hypothesis must be applied with caution in the case of the pycnogonids.

As for the polychaete proboscis, it may well represent the everted stomodeaum rather than a pre-oral structure, as FERRIS and HENRY propose, but that does not mean that we need to consider that it is composed of remnants of primary somites. A suggestive bit of evidence is found in the larval devel-

VOL. 35 1954

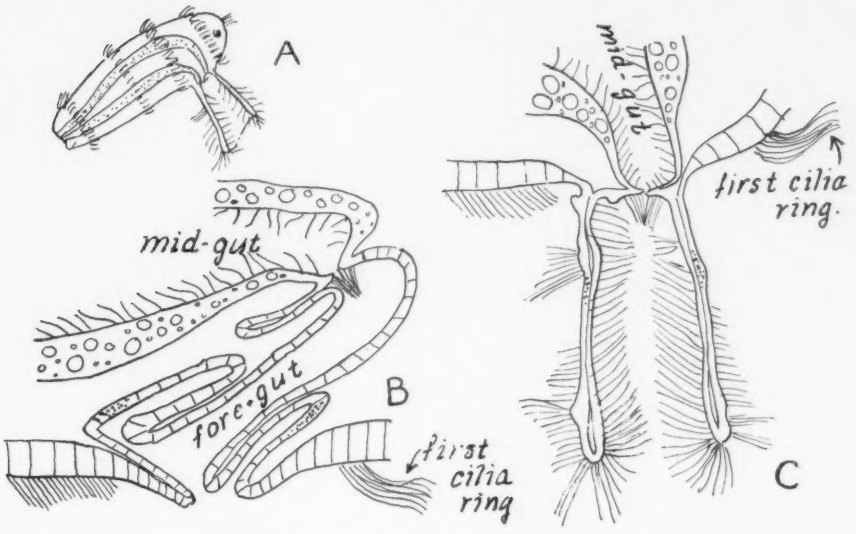


Fig. 9. The larval "proboscis" of *Protodrilus*. A. View of larva; B. proboscis retracted; C. expanded. (After Jägersten.)

opment of the archiannelid *Protodrilus* as described by JÄGERSTEN (1952): "... the larvae of Protodrilus have the foregut evertible in the form of a funnel during the growth period. In other words, this part of the gut is developed into an apparatus of a highly specialized nature for catching microplankton. This is an unmistakable adaptation to the pelagic life." This larval "proboscis" (fig. 9), which is lost in the process of metamorphosis, is apparently a modified stomodeal structure rather than a derivative of primary somites. Such a structure as this lends credence to the suspicion that the polychaete proboscis may be a paedomorphic structure, or certainly acquired after the establishment of primary segmentation. Perhaps the parasitic mode of life of larval pycnogonids led to the formation of a somewhat similar proboscis well after the divergence from the basic articulate (or annulate) stock?[6]

As is well known in phylogenetic circles, FERRIS and his student HENRY have been busy for the last several years trying to establish a new concept of the segmentation of the arthropod head, based primarily on studies of the topographic arrangement of the nervous system in selected annelids and arthropods. According to what might be considered the classical theory of arthropod segmentation, the head consists of a "prostomium" (the remnant of the acron or top of the trochophore), and several (usually 3) pre-oral somites; the

[6] The temptation to add a leaf to GARSTANG's posthumous volume (1951) is irresistible:

The pycnogonid leads a parasitic youth,
and never grows a large abdomen;
A precocious polychaete perhaps,
of arthropods a paedomorphic omen.

mouth may be considered initially the anterior—most structure and to have migrated backward to its present position on the third somite before the evolution of the somites as we know them. FERRIS compares this Lankesterian hypothesis of "adaptational shifting" of the mouth to a "belief in witchcraft" (1950, p. 127), and maintains that there are no true pre-oral somites or a prostomium, that the mouth has attained its present somewhat posterior position by differential growth of the anterior body somites or by their posterior ventral flexure. He contends that the present arrangement of the cephalic ganglia is secondary, that their true origin is indicated by the topographic arrangement of the nerves in the adult example. The conclusions concerning the nature of the insect head which have been reached by this approach are beyond the province of this discussion; the most judicious critique seems to be that by DUPORTE (1953).

Whether deliberate or not, an elaborate scheme of phylogeny imposes interpretations not necessarily in accord with the available facts, and many phylogenies have collapsed from internal stresses. The famous Limulus-theory of PATTEN (1912), which still has its admirers, is the most spectacular example.[7] Since the aim of phylogeny is to propose a plausible explanation for the incomplete record before us, we should not try to bridge the gaps in the present record (to say nothing of the past) with spans whose engineering is basically unsound. The usual device for this is Occam's Razor, which is not an engineering tool but a logical device that cuts as deeply or as superficially as its wielder thinks necessary.[8] It is a rather large assumption to make, that the procession of events in nature coincides with our notions of what is orderly and logical. Perhaps it was some concern over this aspect that caused SNODGRASS to recant: "The head characters of the arthropods will be seen to be so variously distributed in the several arthropod groups that they cannot be made to fit consistently into any theoretical scheme of arthropod interrelationships, and the writer hereby retracts whatever views on the subject he may formerly have expressed." (1951, p. 5.)[9]

The usual refuge from such difficulties is to put things at bit farther off by saying the group involved is polyphyletic, that is, it represents the result of several different lines of descent converging to an apparently similar type. Many perhaps most—phylogenists consider this philosophically untenable, a multiplication of explanations beyond the necessary minimum, comparable, so

[7] GREGORY (1950) regards Patten's book with "profound respect" but nevertheless denies its principal thesis.

[8] FERRIS, especially in his general statements (1948, 1950, 1953), invokes this instrument frequently, yet resorts to less defensible philosophical methods in replying to some of his critics. E.g. "No such nerve appears in our material. No such nerve should be present. If the generalizations previously offered are valid no such nerve can be present." (1953, p. 12.) This may be good debating technique, but it sounds like dialectical materialism on paper although Ferris denies such taint.

[9] While I have fond personal regards for Dr. SNODGRASS, I cannot but wonder what H. J. Hansen would have said about this roosting of his "phylogenetic eagle."

VOL. 35 1954

to speak, "with a belief that nature must then have been playing some pretty tricks in convergent evolution of an inconceivable magnitude" (HESLOP-HARRISON, 1952). At the other extreme we have such efforts as that of Patten to derive the vertebrates from Limulus, or the still unfulfilled promise by RAW (1949) to trace the Arthropoda from a particular family of still-living polychaetes.[10]

While FERRIS and HENRY do not go to the extreme suggested by RAW, a large part of their theorizing is based on the assumption that the parent arthropod stock is similar to the polychaetes *as at present constituted:* "If we assume that that the other groups of the Annulata have actually evolved from ancestors having the same general structure as do the Polychaetes . . ." (HENRY, 1947, p. 94). Even when phylogeny is restricted to the anterior end of the animals, this assumption leads to difficulties, as we have already seen, and much of the argument over whether the mouth shifted backward or the head grew forward seems beside the point in view of the general agreement that the mouth is primitively the anteriormost structure of an elongate, bilateral predecessor to both Annelids and arthropods.[11] One hesitates to remind FERRIS and HENRY that the backward movement of the mouth is plain in many embryos (cf. especially MANTON, 1949), since they have little faith in such observations: "It might be thought that embryology will give us the answer to our problems, but we have the simple fact that embryology has not done so." (FERRIS, 1953, p. 4). Nevertheless, embryological evidence is resorted to by Henry in support of her view that the median rostral nerve of the pycnogonids originated in the tritocerebrum. In any event what is known of the embryology of arthropods and onychophorans indicates that there has been a long period of specialization and larval modification in these groups and that it has proceeded in quite a different direction from that of the polychaetes. While there may be superficial resemblances between the front end of a pycnogonid and a polychaete, the posterior end would seem to have more in common with an arachnid or perhaps the onychophorans. The embryology of the pycnogonids is in some ways more suggestive of the Crustacea than of the Arachnida, but the primary appendages appear after the proboscis although the proboscis originates

[10] RAW, p. 20, writes: "... we can hypothecate for the primitive annelid" but does not mention what he proposes to mortgage for this worm.

[11] If the trochophore larva bears any resemblance at all to the progenitor of the articulate (or annulate) line, the latero-ventral position of the mouth must be viewed as evidence that the "adaptational shift" or "dorsal growth" was a very early development, occurring before the origin of either of the great trochophore lines, the articulate and vermiform branch and the molluscan branch. Of course, a discussion of "pre-oral somites" in the unsegmented mollusca would be even more abstractly academic than many of the arguments about the position of the mouth in a segmented animal, but theories concerning the position of the mouth as related to dorsal ganglia should apply equally to both groups. If, however, we adopt the radiate-acoel hypothesis (Cf. Hyman, The Invertebrates, vol. 2 1951, pp. 5—10) of the origin of a bilateral animal from a solid radial organism with a ventral (or "posterior") mouth, we have to say that the mouth was never anterior to the principal ganglionic mass.

fairly well back on the ventral surface of the adult pycnogonid. This is a bit of a puzzle if we assume that the proboscis is a primitive structure, homologous to the polychaete proboscis. Ferris and Henry would say that it is obvious that the post-oral somites have grown dorsally and anteriorly, leaving the base of the proboscis on the ventral surface. This would be acceptable if the proboscis were a comparatively simple structure, but it is not. In both structure and origin it differs from the polychaete proboscis, and its early appearance in the embryo would seem to be a late specialisation, probably related to the development of a specialized larval stage. Could it be that the Devonian *Palaeopantopus* had simply a ventral mouth and that it was gradually produced forward, thus forming a proboscis? Or has a larval structure similar to that of *Protodrilus* been carried on to the adult? In some protonymphons the dorsal lobe of the proboscis bears a chitinized point—the "arrowhead"—which is a specialized structure for piercing the theca of the hydroid parasitized by the larvae. Was the proboscis originally a piercing structure derived from mouth parts, or is this "arrowhead" a new development?

More difficulties are encountered if the somites posterior to the head region are considered. Probably FERRIS and HENRY did not intend to imply that the stenopod appendage of the pycnogonid is a direct descendant of the polychaete parapodium, although this seems implicit in their scheme of homology. They may well be homonymous, but their differences suggest again that we are dealing divergent lines, and attempts to homologize these structures have not been succesful.

The so-called cement glands of the pycnogonids pose another puzzle. These glands occur on the femurs of the males, and suggest segmental organs derived from primitive excretory organs. A similar pair of glands occurs on the first appendage of the larvae, reminiscent of the cement gland of the Cypris larva of barnacles. Are these cement glands homologous to the slime and crural glands of onychophorans? They seem to be more like the onychophoran structures than the composite coxal glands of arachnids with which they have sometimes been compared.

It is obvious that the plausibility of an elaborate phylogeny is inversely proportional to the number and ontogeny of the organ systems used in constructing the phylogeny. Certainly the sum of morphological and developmental features in the Pycnogonida indicates that they cannot be affiliated with any other arthropod group as at present constituted although one restricted scheme of phylogeny might place them directly on the polychaete stem and another might just as confidently place them near the roots of the Onychophora, and their general aspect has long suggested that they are some sort of arachnids, or at least chelicerates. What little paleontological evidence is available indicates, as MARCUS (1940, p. 119) says, "que os antecessores paleozoicos dos Pantopoda actuaes eram Pantopoda e não Crustacea, ou Arachno-

VOL. 35 1954

morpha." Whatever we may wish to speculate about their origin, we certainly cannot disagree with SNODGRASS (1952, p. 56): "It is impossible to arrive at any positive conclusion concerning the relationships of the Pycnogonida, except that they are Arthropods."

SUMMARY

1. The Pycnogonida cannot be included in the Chelicerata or Arachnida; the term Arachnoidea, an unnatural waste basket category, must be abandoned, and the Pycnogonida should be recognized as an independent arthropod branch. The *Pycnogonida* may be divided in two orders, Pantopoda for the living forms, and Palaeopantopoda for the Devonian fossil *Palaeopantopus*.
2. One of the weakest links in the speculations of the Ferris—Henry school is their assumption that the polychaetes resemble the parent stock of the arthropods. Both must be considered survivors of long evolutionary processes.
3. There is some suggestion that intercalary somites, near the anterior end but posterior to the head may occur in the Pycnogonida but it cannot be said whether this is the result of instability in growth or abnormal chromosome number.
4. It is possible that the polychaete proboscis is a paedomorphic structure; the pycnogonid proboscis may have developed after the divergence of the Pycnogonida as an independent group and the two structures cannot be homologized.

REFERENCES

BROILI, F., 1928. Crustaceenfunde aus dem rheinischen Unterdevon; 1. S. B. Bayer. Akad. Wiss. (Math.-nat.) *1928*: 197—201, pl. 1.
— 1929. Beobachtungen an neuen Arthropodenfunden aus den Hunsrückschiefern. Ein Pantopode aus dem rheinischen Unterdevon. Ibid., *1929*: 272—280, pl. V, 6 figs.
— 1930. Über ein neues Exemplar von *Palaeopantopus*. Ibid., *1930*: 209—214, 1 fig.
— 1932. *Palaeoisopus* ist ein Pantopode. Ibid., *1932*: 45—60, 3 pls., 5 figs.
— 1933. Weitere Beobachtungen an *Palaeoisopus*. Ibid., *1933*: 33—47, 5 pls., 5 figs.
CALMAN, W. T. & GORDON, I., 1933. A dodecapodous Pycnogonid. Proc. Roy. Soc. London (B), *113*: 107—115, 1 fig.
CARPENTER, G. H., 1905. Notes on the segmentation and phylogeny of the arthropods, with an account of the maxillae in *Polyxenus lagurus*. Quar. J. Micr. Sci., *40*: 469—491, pl. 28.
DOHRN, A., 1881. Die Pantopoden des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeresabschnitte. Fauna & Flora Golf Neapel, *3*: 1—252, 18 pls.
DUPORTE, E. M., 1953. The protocephalon: a critique of recent interpretations. Canad. Entom., *85* (2): 41—55, 7 figs.

FAGE, L., 1949. Classe des Pycnogonides *in* de Grassé, Traité de Zoologie, *6*: 906—941, figs. 687—719.

FERRIS, G. F., 1948. The principles of comparative morphology. Microentomology, *13* (3): 50—56.

— 1950. A reply to criticism. Ibid., *15* (4): 126—128.

— 1953. On the comparative morphology of the Annulata. A summing up. Ibid., *18* (1): 1—15.

GARSTANG, W., 1951. Larval forms and other zoological verses. Oxford, Basil Blackwell. 85 pp., frspce. (posthumous)

GREGORY, W. K., 1950. Parallel and diverging skeletal evolution in vertebrates and arthropods. Evolution, *4* (2): 164—171, 4 tables.

HANSEN, H. J., 1925, 1930. Studies on Arthropoda, II, III. Copenhagen, Gyldendalske Boghandel.

HANSTRÖM, B., 1919. Zur Kenntnis des centralen Nervensystems der Arachnoiden und Pantopoden. Lund: Aktiebolaget Skånska Centraltr., 191 pp., 66 figs.

HEDGPETH, J. W., 1947. On the evolutionary significance of the Pycnogonida. Smiths. Misc. Colls., *106* (18): 1—53, 1 pl., 16 figs.

HENRY, L. M., 1947. The nervous system and the segmentation of the head in the annulata, III Polychaeta. Microentomology, *12* (4): 83—110, 16 figs.

— 1948. V., Onychophora. Ibid., *13* (2): 27—30, figs. 10—12.

— 1953. The nervous system of the Pycnogonida. Ibid., *18* (1): 16—36, 15 figs.

JÄGERSTEN, GÖSTA, 1952. Studies on the morphology, larval development and biology of Protodrilus. Zool. Bidr. Uppsala, *29*: 425—512, 3 pls., 40 figs.

LANKESTER, E. R., 1904. The structure and classification of the arthropoda. Quar. J. Micr. Sci., *47*: 523—582, pl. 42, 11 figs.

LINDER, F., 1945. Affinities within the Branchiopoda, with notes on some dubious fossils. Ark. Zool., *37 a* (4): 1—28, 10 figs.

MANTON, S. M., 1949. Studies on the Onychophora. VII. The early embryonic stages of *Peripatopsis,* and some general considerations concerning the morphology and phylogeny of the Arthropoda. Philos. Trans. Roy. Soc. London (B), *233*: 483—580, pls. 31—41, 7 figs.

MARCUS, E., 1940. Os Pantopoda brasileiros e os demais sul-americanas. Bol. fac. fil Ciên. letr. São Paulo, *19* (Zool. 4): 3—179, 7 pls.

— DU B-R., 1952. A hermaphrodite Pantopod. Anais. Acad. Bras. Ciên. *24* (1): 23—30, 9 figs.

MORTENSEN, TH. 1920. Studies in the development of crinoids. Papers Dept. Mar. Biol. Carnegie Inst. Wash., 16: 1—94, 28 pls.

PATTEN, W., 1912. The evolution of the vertebrates and their kin. Philadelphia, Blakiston's. xxi + 486 pp., illus.

PETRUNKEVITCH, A., 1949. A study of Paleozoic Arachnida. Trans. Conn. Acad. Arts & Sci., *37*: 69—315, pls. 1—83.

— 1952 a. Macroevolution and the fossil record of Arachnida. Amer. Scientist., *40* (1): 99—122, 12 figs.

— 1952 b. Principles of classification as illustrated by studies of Arachnida. Syst. Zool., *1* (1): 1—19, 8 figs.

PRYOR, M. G. M., 1951. On the abdominal appendages or larvae of Trichoptera, Neuroptera, and Lepidoptera, and the origins of jointed limbs. Quar. J. Micr. Sci., *92* (4): 351—375. 30 figs.

RAW, F., 1949. Some stages in the evolution of the nervous system and the fore-gut of the polychaet. Smiths. Misc. Colls., *111* (8): 1—35, 5 figs.

VOL. 35 1954

REMANE, A., 1952. Die Grundlagen des natürlichen Systems der vergleichende Anatomie und der Phylogenetik. Leipzig, Akad. Verlag. 400 pp., 82 figs.

SNODGRASS, R. E., 1951. Comparative studies on the head of mandibulate Arthropods. Ithaca, Comstock Publ. Co., vii + 118 pp., 37 figs.

— 1952. A textbook of Arthropod Anatomy. Ithaca, Comstock Publ. Co., viii + 363 pp., 88 figs.

STØRMER, L., 1944. On the relationships and phylogeny of fossil and recent Arachnomorpha. Skrift. Norske Vidensk.-Akad. Oslo, Mat.-Naturv., *1944* (5): 1—158, 30 figs.

WIRÉN, E., 1918. Zur Morphologie und Phylogenie der Pantopoden. Zool. Bidr. Uppsala, *6*: 41—181, pls. 9—16, 40 figs.

L.
5
54

VOL.
35
1954

DEVELOPMENTAL BIOLOGY OF PHORONIDEA OF THE GULLMAR FIORD AREA (WEST COAST OF SWEDEN)

BY

LARS SILÉN

CONTENTS.

Introduction 215
Sexual conditions and spawning in *Ph. pallida, Ph. mülleri,* and *Ph. hippocrepia* . . 217
Early development in *Ph. pallida, Ph. mülleri,* and *Ph. hippocrepia* 222
Actinotrochae 223
Metamorphosis of the Actinotrochae 233
Development of *Ph. ovalis* 240
Discussion 249
Summary 255
Literature 256

L.
5
54

INTRODUCTION.

The development of Phoronis has been studied by several authors. Their work has been concentrated on the structural differentiation (egg cleavage and early development, organization of the Actinotrocha larva, structural changes during the metamorphosis). However, we generally find only cursory observations concerning the combination of the different stages into coherent series as well as the biological occurrences connected with the development. In fact, the life history is known only for one member of the group, and that incompletely. This state of things is mainly due to such practical obstacles appearing in the phoronids as the difficulties to settle the time and mode of spawning, to rear the embryos, to bring about metamorphosis regularly, etc.

A considerable number of different Actinotrochae as well as of different adult phoronids have been described, 25—30 and about 15 respectively (the approximation is due to the questionable validity of certain types proposed). CORI (1939, p. 174) remarks that it is "sehr bemerkenswert dass von den 16 in der Literatur beschriebenen Vertretern der Phoronidea die zugehörige Actinotrocha in der Hälfte der Fälle bisher unbekannt geblieben ist". In fact, the situation is still worse as is seen even from CORI's taxomomical survey of the phoronids. The larvae of 10 of the 16 adult forms enumerated there are entirely unknown. In one case the combination of larva and adult (*A. pallida* —*P. ovalis*) cautiously proposed by SELYS—LONGCHAMPS (1907, p. 190) is erroneous (BRATTSTRÖM 1943, SILÉN 1952, cf. further below). In two cases (*Ph.*

architecta, Ph. ijimai) the corresponding combination is guesswork (the case of the latter form is the more dubious as its own validity is admittedly questionable). The cases of *Ph. psammophila* and *Ph. hippocrepia* seem confused: the larva of *Ph. psammophila* is said to be *A. hatschcki, Ph. sabatieri* Roule is identified with *Ph. psammophila* but *A. sabatieri* Roule is combined with *Ph. hippocrepia,* all this for unclear reasons. We shall see below (p. 232) that at least the last-mentioned combination is not correct.

Remains *Ph. mülleri* as the only phoronid the developmental history of which from ovum to adult is fairly well known (SELYS-LONGCHAMPS 1902, 1903, 1907); its larva is *A. branchiata.* To it can be added *Ph. pallida* in so far as the adult recently described (SILÉN 1952) has the characteristic muscle formula given by SELYS-LONGCHAMPS for just metamorphosed specimens of *A. pallida* and thus can be connected with this long-known larva (SCHNEIDER 1862).

From the Gullmar area four species of Phoronis are known, viz. *Ph. pallida* (Schneider), *Ph. mülleri* Selys-Longchamps, *Ph. hippocrepia* Str. Wright, and *Ph. ovalis* Str. Wright (SILÉN 1952). This is a unique number in so restricted an area and the possibilities of contributing to the filling up of the gaps just mentioned ought to be good.

Consequently, the present author undertook an investigation of the development of these forms, during the years 1950—1953, at the Marine Zoological Laboratory Kristineberg situated in the area. Here I wish to express my sincere thanks to the curator of the laboratory, Fil. dr. GUNNAR GUSTAFSON, and to the assistant naturalist there, Fil. lic. LENNART HANNERZ, who facilitated my work in every way.

Three main tasks were attempted: (a) investigation of the sexual propagation of adults and rearing of the fertilized ova, (b) investigation of the free larvae and cultivation of different stages of them, (c) observations on the settlement and metamorphosis. In this way it was possible to connect the pelagic forms at both extremities of their development with the respective adults.

Three developmental types proved to be represented among the four species studied. *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* belong to the phoronids shedding their ova directly into the water, *Ph. hippocrepia* to those protecting the brood during part of its development in the tentacle crown. The two types thus indicated do not differ more than that they can well be treated together. The development of *Ph. ovalis* exhibits so altogether different features that it was found the most convenient thing to deal with it separately.

VOL. 35 1954

SEXUAL CONDITIONS AND SPAWNING IN *PH. PALLIDA, PH. MÜLLERI,* AND *PH. HIPPOCREPIA.*

In spite of much discussion, the problem has long remained unclear whether the phoronids are dioecious or hermaphroditic and, in the latter case, whether they are proterandric or not. Entangled with this problem are the questions where and when the fertilization takes place and whether autofertilization is possible. (Cf. SELYS-LONGCHAMPS 1907, pp. 119 ff., and SILÉN 1952, pp. 127 ff.)

Quite recently RATTENBURY (1953) has succeeded in unravelling these problems in a convincing way in the Californian species *Ph. viridis*. This form is, in all probability, dioecious (the remaining, unlikely possibility is that it is proterandric in the extreme). Autofertilization is out of the question. The sperms enter the body cavity of the female through the nephridia and enter the ova that are free there when the nuclei of the latter are in the first metaphase. The ova are then liberated, the second polar bodies are formed, and immediately after that the male and female nuclei fuse. Thus, all of the ova shed by the female cleave also in the absence of males at this moment. Lophophore organs are reported to be lacking in this form.

Ph. pallida and *Ph. mülleri* are hermaphroditic (SILÉN 1952). Several facts show that the hermaphroditism is not proterandric (or protogynic) but simultaneous.

In thin sections of sexually mature individuals all developmental stages of the germ cells are found in the testis as well as in the ovary (SILÉN l.c.).

Male germ cells in different stages of maturing up to fully mature sperms occur free, regularly and abundantly, in the body cavities of the same individuals.[1] The completeness of the series of developmental stages speaks in favour of these mature sperms being of the animal's own production, a conclusion that is supported by other facts, as will be seen below. This contrasts with the conditions in *Ph. viridis,* where the sperm free in a body cavity containing ova as well, is always of foreign origin.

The same body cavities simultaneously contain ova in the first meiotic division. As seems to be the case in the phoronids in general, the second polar body is formed soon after the liberation of the ovum. As observed by SELYS-LONGCHAMPS, the fact is probably that the second meiotic division takes place only when the ovum comes into contact with sea-water. This is in accordance with RATTENBURY's (1953, p. 192) observation that "Once the ova has passed — — — into sea water the egg nucleus becomes active". In spite of most

[1] Fil. mag. ÅKE FRANZÉN of the Zoological Institute at Uppsala, who is investigating the structure of sperms in a number of invertebrate groups, studied the sperms of the forms now discussed in 1953 and has kindly informed me that his observations confirm this statement.

careful examination, I have failed to observe the presence of male nuclei in ova from the body cavity in the present forms. The female nuclei were quite easily discernible, and I am inclined to state that male nuclei are, really, absent here. This is in contrast to conditions in *Ph. viridis* as described by RATTENBURY, but agrees with the statements of TORREY (1901; *Ph. pacifica*) and BROOKS & COWLES (1905; *Ph. architecta*) that the sperms do not enter the ova until the latter are shed. However, sperms can, in fact, enter the ova in the body cavity in at least *Ph. mülleri* (as well as *Ph. "sabatieri"*) as shown by SELYS-LONGCHAMPS's observation of the occasional presence there of embryos (sometimes in *Ph. viridis* as well, according to RATTENBURY). SELYS-LONGCHAMPS himself found this phenomenon exceptional and abnormal and, considering the probable absence of autofertilization as well as of foreign sperms in the body cavity of the present forms, the present author feels inclined to assume that in these cases the animals had been severed during the unavoidable extraction from their tubes, sea-water containing foreign sperms then entering the body cavity.

The development, maturing, and liberation of the germ cells in *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* take place during the same period of the year. Specimens with ovocytes in the first meiotic division free in the body cavity were obtained as early as the middle of June. No specimen was found to shed its eggs before July 18. Thus, as long as one month seems to elapse between ovulation and egg-laying.

In all cases observed the egg-laying took place at night, as found by BROOKS & COWLES (1905, p. 77) in *Ph. architecta* and by RATTENBURY (1953, p. 190) in *Ph. viridis*. As was to be expected, the property of the night that is of main importance in this connection is, simply, the darkness. Animals kept in darkness shed their eggs also in daytime.

One and the same specimen generally laid eggs during two or three subsequent nights, one specimen of *Ph. pallida* during as many as six nights. However, it is quite possible that the ceasing of the egg-laying after these comparatively long periods was, in fact, due to the special conditions in captivity and that the spawning period is even longer in nature.

In an undisturbed heap of eggs delivered during one night are found stages from unsegmented eggs to 32-cell stages. The egg-laying of these species can thus be described as a continuous one, lasting for several days but interrupted by periods of light. It follows from this that there is another possible error contained in the fact that the observations were performed on animals in unnatural surroundings. The species in question live at a depth of about 10 m, *Ph. mülleri* even down to more than 50 m. Even at a depth of 10 m the daylight is reduced to such a degree that the animals are possibly not sufficiently disturbed to interrupt their breeding activity which may then be wholly con-

VOL. 35 1954

tinuous and the true length of the breeding period of the single specimen may then be shorter. Unfortunately, it has not been possible to solve this problem.

As regards the probably dioecious *Ph. viridis* RATTENBURY (1953, p. 190) states that "it seems likely that both sexes spawn more than once during the breeding season". There are no indications of the existence of a similar phenomenon in the present species.

The members of one and the same population spawn at different times. Thus, egg-laying specimens of both of the species now under consideration were obtained in the latter half of July and throughout August. These times consequently represent the minimum periods for their spawning in the present area. The Actinotrochae belonging to the two species occur in the plankton until December. This fact might be interpreted to indicate that they have a considerably longer reproductive period than indicated above. However, it should be observed that of the two species discussed only specimens from populations in shallow water—10—15 m—were examined. At least *Ph. mülleri* occurs also at greater depths, down to 50 m (GUSTAFSON 1936). Here the reproduction certainly takes place later in the season and it can be suspected that the larvae appearing in the late autumn come from such populations.

As long or even longer spawning periods have been reported for other phoronids: March—April for *Ph. viridis* in California (RATTENBURY 1953, p. 193), November—June for *Ph. "ijimai"* in Japan (IKEDA 1901, p. 510), March—December for *Ph. architecta* in N. Carolina (BROOKS & COWLES 1905, p. 76), etc.

The phoronids obviously do not belong to the numerous sessile animal types spawning "epidemically".

Ph. mülleri and *Ph. pallida* lay their eggs in concentrated groups on the substratum, where they remain motionless until they reach the blastula stage (in nature they perhaps do not rest on the substratum but are swept along by currents). In both forms a maximum number of about 500 eggs were observed to be shed by each specimen.

When shed, the eggs attain a spherical shape contrasting with their oval shape when still in the body cavity (cf. for instance SILÉN 1952, fig. 54). Their diameter is: in *Ph. mülleri* $< 60\,\mu$, in *Ph. pallida* $> 60\,\mu$.

The following additional observations concerning the spawning were made.

(1) The ova just liberated are uncleaved and do not begin cleaving until at least one hour after their liberation.

(2) One single specimen among several placed in the same jar sheds its ova. The ova cleave normally.

(3) After 1—3 subsequent nights of egg-laying the specimen is removed to a jar by itself. The egg-laying is continued but the ova do not cleave.

(4) The specimen is brought back to the original jar. The egg-laying is continued and all the ova cleave normally again.

(5) If during the breeding season a number of specimens just collected are isolated in separate jars, one or more of them usually start shedding their ova immediately. Others may start liberating the eggs after a few days. In none of these cases did the ova develop further.

(6) The author failed to observe any sperms in a jar occupied by a specimen shedding eggs.

These observations are instructive in several respects.

In the present forms the entrance of sperms into the ova takes place after the liberation of the latter, the fusion of the male and female nuclei shortly after that entrance.

The appearance of embryos in the body cavity of *Ph. mülleri* is confirmed to be an abnormal feature.

The conclusion is strengthened that the mature sperms present in the body cavity are produced by the animal itself and are not of foreign origin as in *Ph. viridis*.

Autofertilization does not take place, neither in the body cavity nor after the liberation of the ova.

It is definitely established that specimens not in the state of shedding ova are nevertheless able to liberate sperms. Further, it seems probable that specimens shedding ova do not simultaneously liberate sperms. In spite of the simultaneous presence in the body cavity of mature sperms and ova ready to be evacuated, the present species thus appear, in some way unknown, to keep separate the evacuation of sperms and the evacuation of ova. This is the only hint in these species of a chronological precedence of the activity of one of the sexes before the other; it is not known whether one of them regularly precedes the other and, if so, which one comes first.

The lophophore organs, present also in *Ph. mülleri* and *Ph. pallida* during the breeding season, have been supposed by some authors to function as receptacula seminis (cf. the surveys of SILÉN 1952, pp. 128 ff., and 1954, pp. 16 ff.). This possibility is now ruled out, for the present forms at least. It is worthy of notice that *Ph. viridis* lacks these organs altogether.

In different groups of marine invertebrates delivering the sperms and ova directly into the water there appear various arrangements apt to reduce the wastage of reproductive cells and secure fertilization (cf. for instance THORSON 1950, p. 7, and 1952, pp. 279 ff.). So it seems to be a common phenomenon in sessile forms that the release of the sperm by the males induces the females to shed their ova (this is, of course, true also of hermaphroditic animals at the moment functioning as males or females). The above observations exclude the existence of such conditions at least in the present phoronids.

To sum up, *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* agree with *Ph. viridis* as regards the place and time for the meiotic divisions of the ovocytes, their liberation,

VOL.
35
1954

and the absence of autofertilization. Furthermore, none of them are provided with receptacula seminis; the lophophore organs present in the two former species do not possess that function.

The former species disagree with the latter in being simultaneous or almost simultaneous hermaphrodites, in foreign sperms not entering the body cavity normally, and in the entering of the sperm into the ovum after the liberation of the latter.

As regards *Ph. hippocrepia* the author did not succeed in revealing the details of the sexual and breeding conditions in this species with the same exactitude as in the other two. This is due to its special life conditions. It burrows in solid calcareous matter and by means of asexual reproduction it gives rise to an entangled group of individuals traversing the substratum in an irregular way. These circumstances render it impossible to obtain the isolated living and unsevered specimens necessary for a study of the existence and nature of the sexual interrelations of the various individuals.

Sexually active specimens of *Ph. hippocrepia* were found during August in the area studied. Complete series of the developmental stages of the germ cells in the testis and ovary as well as in the body cavity, including mature sperms and ovocytes in the first meiotic division, were found simultaneously in one and the same specimen. No male nuclei were observed in these ovocytes.

As far as the evidence goes, consequently, *Ph. hippocrepia* agrees with *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* in being a simultaneous hermaphrodite and in the fertilization taking place after the liberation of the ova. Though the assumption is probable that autofertilization does not take place and that the lophophore organs present do not serve as receptacula seminis (nor do any other organs), this is a mere inference in the absence of direct observations.

The ova shed average 100 μ in diameter.

The ova are deposited in the tentacle crown.

It has long been known that the mass of eggs and embryos contained in a tentacle crown of *Ph. hippocrepia* and certain other phoronids represent a continuous series of stages from unsegmented eggs to young larvae on the verge of beginning their free life. The conclusion is that the eggs are shed, by one and the same specimen, continuously throughout a fairly long time, thus in the same way as in *Ph. pallida* and *Ph. mülleri*. In *Ph. hippocrepia*, too, the egg-laying appears to be inhibited in daytime.—In this connection it should be kept in mind that these conditions are apparently not valid for all forms with brood protection in the tentacle crowns. SELYS-LONGCHAMPS (1907, p. 120) has drawn attention to the fact that in *Ph. psammophila* and *Ph. sabaticri* (possibly identical, cf. CORI 1939, p. 160) all the embryos of one tentacle crown are at the same stage of development. This indicates that in those forms all the ova are shed instantly.

It proved very difficult to estimate the number of eggs produced during the season by one specimen in *Ph. hippocrepia* owing to the successive addition of new eggs to the tentacle crown and the simultaneous escape of young larvae. However, probably it does not exceed a total of 100.

EARLY DEVELOPMENT IN *PH. PALLIDA, PH. MÜLLERI,* AND *PH. HIPPOCREPIA.*

To rear Actinotrochae from ova under laboratory conditions has always proved a difficult task. LEBOUR (1922) reported that peridinians, not diatoms, form the food specific for Actinotrocha. MAC GINITIE (1937, p. 197) stated briefly that he had succeeded in rearing larvae of *Ph. viridis* in finger bowls with filtered sea-water to which diatoms were added; the stages obtained were not described. The same method was tried by the present author but with little success also when the diatoms were substituted with chloromonads or Nitschia (cf. also VEILLET 1941, p. 2). However, fairly good results were obtained when the larvae were removed once or twice a day into finger bowls with a fresh supply of sea-water. After having become mobile the embryos were isolated in separate bowls (cf. MAC GINITIE). It can be said that if treated in this way the larvae developed normally for six or seven days. The development possibly slowed down a little towards the end of the period, then definitely decreased and finally came to a complete standstill, probably owing to the supply of adequate food nevertheless being insufficient.—The temperature was kept constantly at + 17° C., in the jars for adults as well as for larvae, as this seems to correspond approximately to the conditions reigning in the upper water layers at the height of the breeding season.

No new observations of interest were made concerning the segmentation of the ovum and the further internal differentiation of the embryo.

There are practically no previous reports on the rate of progress of the early development in Phoronis.

In the non-broodprotecting forms *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* the immobile stage lasts for about 20 hours, the blastula stage then being reached. The blastulae circle busily about under clockwise rotation. They show no special reaction to light. After 15—20 hours gastrulation begins (which coincides approximately with SELYS-LONGCHAMPS's, 1903, p. 37, remark: „Die Gastrulation findet schon am zweiten Tage statt."). The gastrulae react positively to light, not strongly but quite clearly, as do all older larvae of the species observed. After another 20 hours the hood is developed and a general shape is reached making the body recognizable as an Actinotrocha. 25—30 hours later the ciliated ridge, which subsequently gives rise to the tentacles, is well defined and the larvae now correspond closely to the 4-day old larva of *Ph.*

VOL. 35 1954

mülleri depicted by SELYS-LONGCHAMPS (1903, p. 38, Pl. 1, fig. 3; apart from the remark on the gastrulation cited above this seems to be the only specification of time given in the literature concerning the rate of development in Phoronis). Two days later the first two tentacle pairs appear almost simultaneously.

Thus the development from the fertilized ovum to the appearance of the tentacles takes place in about six days in *Ph. pallida* and *Ph. mülleri*. The rate of development indicated may correspond to the natural one. It may possibly be assumed that the larva depends on the stored yolk for its development until its main food-collecting apparatus, the tentacles, begin to form; that being the case, the larva is lecitotrophic until the tentacles are formed, planktotrophic after that point. In fact, the present author did not observe any catching of food nor any contents in the alimentary canal during the former stage; it should be kept in mind, however, that even if present these things must be extremely difficult to observe. Furthermore, the growth and differentiation of the larvae reared in the laboratory always slowed down quite definitely soon after the appearance of the first tentacles and came to an absolute standstill 3—4 days later on (though the larvae often kept alive for another two or three weeks).

L.
5
54

The case of *Ph. hippocrepia* is of interest in this connection. Here the embryos develop inside the tentacle crown till or almost till the formation of the first two tentacle pairs, a developmental period corresponding to that just discussed in *Ph. pallida* and *Ph. mülleri*. Its duration is 4 ½—5 days. Here we know for certain that no food is taken in. As seen from the measurements given above, the size of the egg and consequently its amount of yolk is much greater in *Ph. hippocrepia* than in the other two species. As that amount suffices exactly to bring its embryo to the stage with two pairs of tentacles, one might be tempted to conclude that in the other species the amount is too small to allow of a lecitotrophic mode of life during the entire period in question. However, this comparison suffers from obvious deficiencies: the condition for its being correct is that the result of this period of development is the same in the two cases. The result must be measured in the quantity of tissue formed during the period. It is true that the exterior measurements of the embryo bodies in the two cases are approximately the same. However, considering the differencies in the density of the tissues, etc., that may exist, it is evident that those measurements do not say very much.

ACTINOTROCHAE.

In the fishing of plankton for the present purpose a net with a mesh width of 294 μ was generally used. Though it would seem reasonable to expect the

quite young Actinotrochae to pass this net, a considerable number are nevertheless obtained as they are retained by the masses of other organisms. If a finer net is used they are, though certainly present, very difficult to observe owing to the dense masses of phytoplankton formed, from which they seem unable to disengage themselves.

The fact that the present author as well as SELYS-LONGCHAMPS (1903, p. 37) has failed to obtain cleaving stages or blastulae in the plankton is evidently due to these bodies lacking positive phototaxis. Young gastrulae, which are distinctly positive in their reaction to light, are only occasionally found and even older ones are rare. Possibly we can here use the explanation supplied by SELYS-LONGCHAMPS of the absence of b l a s t u l a e in the plankton: the young gastrulae ascend from the bottom, where earlier stages have developed, towards the surface but the rate of their progress is slow and, owing to the rapidity of their development in this period, they have already transformed into older types when they reach higher levels.

Owing to the differences in behaviour and possibly also to the differences in size between *A. branchiata,* on one the hand, and the two other Actinotrochae of the waters discussed, on the other (cf. below), a different technique must be employed to sort them out from the plankton samples. If the temperature of the room where this work is performed is higher than that of the seawater, which is mostly the case, the temperature of the plankton sample of course increases gradually during the examination. The decreasing density of the water affects the big and mainly floating *A. branchiata* (particularly specimens with 6—7 pairs of tentacles or more) considerably: it is soon found chiefly on the bottom of the jar under inspection. The small and more actively swimming *A. pallida* and *A. hippocrepia* as well as the young stages of *A. branchiata,* on the other hand, are still found at the surface. It is postulated that the light strikes the jar from above and, furthermore, that the larvae are in a photopositive stage; mature larvae of all the forms are always found at the bottom (cf. next chapter). It is indeed of great importance to keep these conditions in mind or else one or the other type is quite easily overlooked though really present.

When captured the larvae were immediately identified as regards species and stages of development. The determination of the latter was first of all based on the number of tentacles. Though the correlation between tentacle number and the differentiation level of the other organs is not absolute, the deviations are, largely, of no consequence. Owing to the large number of tentacles in *A. branchiata,* this type of larvae could be gradated in detail. In the remaining types dealt with here the tentacles are comparatively few and appear at considerable intervals, and in them it was found convenient to consider also the size of the tentacle pair last formed in order to reach a satisfactory estimation of the age. All the time it is necessary to be on the outlook

VOL. 35 1954

for and remove the not infrequent specimens that exhibit abnormalities in one way or other.

When thus examined the larvae were placed each in a finger-bowl with a fresh supply of sea-water that was subsequently changed at convenient intervals (cf. above). Their further development was recorded once, sometimes twice a day, but not for a longer period than six days as it was soon found that the subsequent progress of the development was so often disturbed that it seemed safest to disregard entirely the occurrences after that period.

The starting-point in these researches was the very young stages fished in the plankton, stages that were younger than the oldest ones obtained by rearing from ova of the non-broodprotecting species or equal in age with those obtained directly from the tentacle crown in *Ph. hippocrepia*. When duly identified these specimens were reared for six days; newly captured specimens younger than the most advanced stage reached by the former were reared for six days; newly captured specimens younger than the last stage thus obtained were then reared for six days, etc. Each stage was secured by rearing several specimens.

In this way we get, as the first result, series of morphologically corresponding stages the mutual connections of which are definitely settled by the overlapping of the respective stages. These series are connected, at one end, with those reared from ova of established provenience and, at the other end, via the metamorphosis with the adult animal again.

Furthermore, the space of time necessary for a larva to proceed from one stage to another can be worked out and, consequently, the duration of the entire development as well as of the pelagic life can be settled. Of course, one has to keep in mind the possible influence of the laboratory conditions, which, as already demonstrated above, tend to slow down the rate of development thus perhaps making the length of the periods somewhat greater than it is in nature.

The time elapsing between the four-tentacle stage and the metamorphosis seems to be almost exactly the same in the three species, viz. 12—14 days, thus the same in the non-broodprotecting forms as in *Ph. hippocrepia*. The duration of the whole of the pelagic life thus averages 17—20 days in the former types, 12—14 in the latter, and the difference is, consequently, exclusively due to the withholding of the embryos from the plankton during the first days in *Ph. hippocrepia*. This result is to some extent suported by the fact that in all the summers 1951—1953 during which observations were made, a time of about 3 weeks was found to elapse between the first appearance of very small *A. pallida* and *A. branchiata* in the plankton and the appearance of mature larvae.

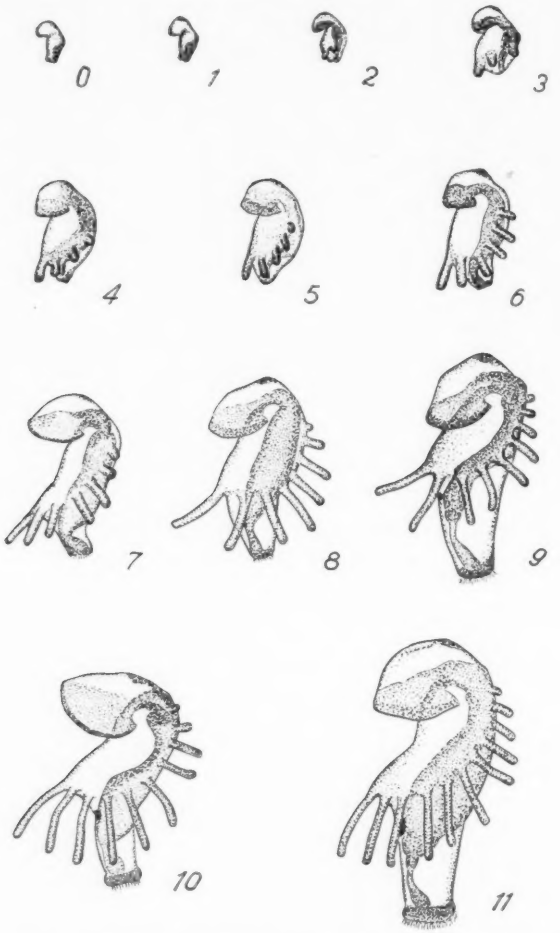
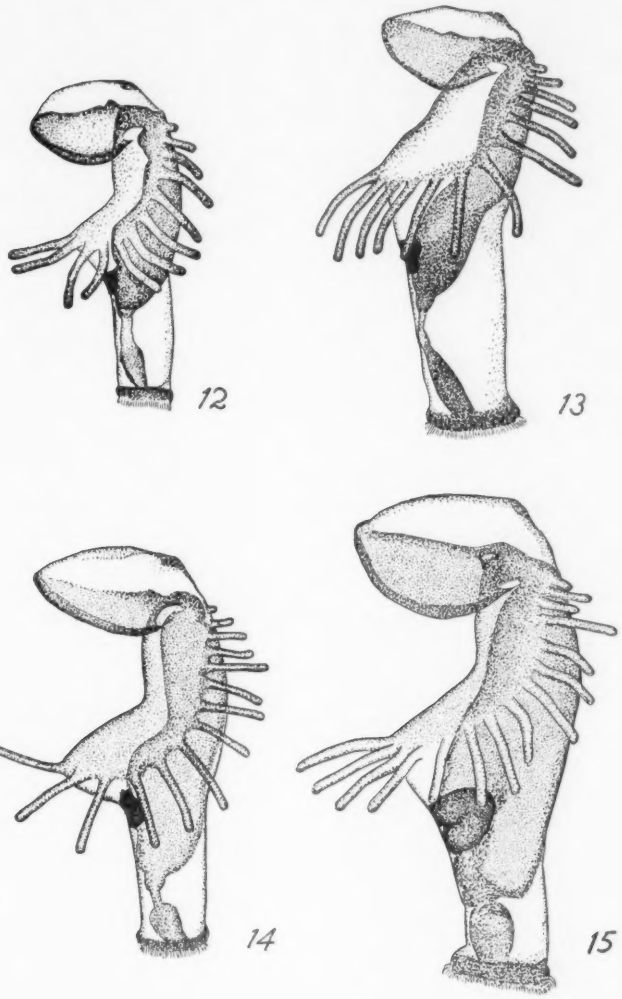


Fig. 1. *Actinotrocha branchiata*. Series of stages from that devoid of tentacles to that with 15 pairs of tentacles. Figure at each stage shows number of tentacle pairs. Internal metasoma sac pictured as dark ventral body from stage 9 onwards. Lateral views. 55 ×.

A. branchiata is common in the plankton of the Swedish west coast "during late summer and autumn" as stated by THÉEL (1907, p. 39) and GUSTAFSON (1936). AURIVILLIUS (1898) reported that "Phoronis larvae" occurred from June to December, once even in May, during the years 1894—1897. The form observed is probably *A. branchiata*. The specimens obtained in May and June were probably transported into the present area from the south (e.g., Heligoland), where the spawning occurs earlier (cf. below). — This is all we have known about the occurrence of Actinotrochae in these waters.

It was soon clear to the author that two types of Actinotrochae are common there in August-October. One is represented by the large and charac-

VOL.
35
1954



teristic *A. branchiata,* the other by small forms similar to *A. pallida* (SCHNEIDER 1862). The latter proved, in fact, to consist of the larvae of two different species, fairly similar as regards size, general appearance, and behaviour, and thus difficult to keep apart. This type of small Actinotrochae seems largely to have been overlooked. *A. pallida* has been reported only a few times, by its discoverer SCHNEIDER as well as by SELYS-LONGCHAMPS (1903, p. 45) and CORI (1939, p. 163). It is quite possible that the second form has been confused with *A. pallida.* It was identified with *Ph. hippocrepia* and is referred to in the following pages as *A. hippocrepia.*

Only fully or at least well developed specimens of the various Actinotrochae

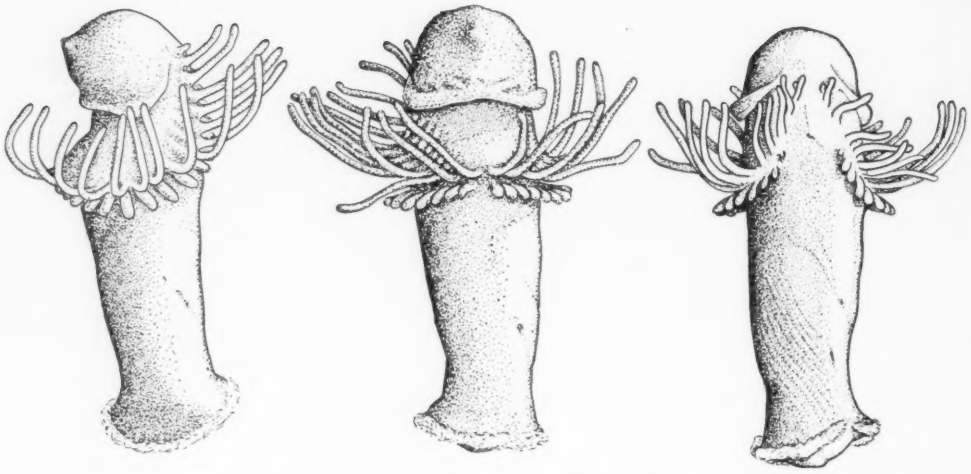


Fig. 2. *Actinotrocha branchiata.* Specimen ready to metamorphose in (from left) lateral, ventral, and dorsal view. Body opaque. Sensory organ projecting. Row of definite tentacles formed, with ventral and dorsal growing zones. 45 ×.

VOL. 35 1954

are depicted in most of the earlier literature. *A. branchiata* is an exception, as SELYS-LONGCHAMPS (1902, 1903, 1907) has given beautiful figures of several stages of it. If full-grown specimens of various Actinotrochae are not always easy to distinguish, this is even truer of their young stages. Therefore, drawings of all stages of the three forms now discussed have been made for the series figs. 1—4. The figures were drawn from narcotized specimens (cocaine hydrochloride has a fairly good effect) but in a few cases drawings of larvae fixed without any narcotization are presented as well in order to give some idea of the influence of contraction on their appearance. However, it should be observed that also in the narcotized specimens of *A. pallida* and *A. hippocrepia* the soma is considerably shortened. This apparently unavoidable defect accounts for the disagreement between the figures of the length of the larvae given in the text and in the pictures.

1. ***Actinotrocha branchiata,*** Müller 1846. Figs. 1—2.

Larva of *Phoronis mülleri,* Selys-Longchamps 1903.

This form was well defined by, among others, SELYS-LONGCHAMPS 1907, p. 189. It is easily recognizable, as compared with other Actinotrochae of the present region, above all by its unusual size (up to 2 mm in length), transparency, pigmentiferous amoebocytes, and large number of tentacles (up to 16 pairs). It possesses one pair of sanguinary globules, which fuse at the metamorphosis.

When approaching the metamorphosis the appearance of the larva changes considerably (fig. 2). The definitive tentacles, separate from the larval ones

and divided into two groups, have now appeared. The entire animal becomes opaque. The hood is contracted into the shape of a rounded helmet. From its fronto-distal side the sensory organ protrudes into a sharp point, a feature, however, that is not permanent as the knob can be drawn in momentarily (cf. further below).

The existence of two zones where new tentacles are formed in the row of definitive tentacles, is unique for *Ph. mülleri* among the adult phonorids. Consequently, we have in their presence in the old *A. branchiata* a means of checking, even at this stage, that the preliminary reference of that larva to *Ph. mülleri* is correct.

The movements of the larva are also characteristic. It normally moves slowly and with dignity, showing no changes of shape except occasional jerks of the hood or the anal papilla. Or it floats erect, being otherwise motionless. Only towards the metamorphosis does a more energetic behaviour occur (cf. further below).

A. branchiata has been reported from the southern Baltic, the North Sea, the seas round the British Isles and the west of France, and the Mediterranean.

In the Gullmar area the author obtained the first specimens (very young, tentacles absent) on July 18, the last ones on December 15. It is particularly common towards the end of August and in September. For comparison it may be mentioned that at Heligoland it was found as early as June 9 and then until November 8 with a maximum in August (SELYS-LONGCHAMPS 1903, pp. 34—35).

L.
5
54

2. ***Actinotrocha pallida,*** Schneider 1862 (*partim?*). Fig. 3.

Larva of *Phoronis pallida,* Silén 1952.

This larva is small, maximum 0.6 mm of length, opaque, yellowish white, wholly devoid of pigmentiferous amoebocytes. The present author never observed more than 5 tentacle pairs but SELYS-LONGCHAMPS (1903, p. 46) reports one additional pair sometimes to appear just before the metamorphosis. There is one single sanguinary globule. The larva ready to metamorphose does not exhibit any special morphological characteristics.

The larva behaves in a way quite different from *A. branchiata.* It rushes along, its body stiff and its tentacles contracted, horizontally, or vertically upwards, only to dive directly down again. Now and then it checks its swift progress and floats for one or several minutes, its tentacles expanded, only to make a sudden rush soon again.

Without doubt ROULE (1900) was wrong in considering this form to be a young stage of *A. branchiata* as is evident even from the careful descriptions of SCHNEIDER (1862) and SELYS-LONGCHAMPS (1903, 1907). Attempts to connect it with the adult *Ph. hippocrepia* (incl. *Ph. gracilis*) or *Ph. ovalis* are erroneous, but its belonging to the recently discovered adult called *Ph. pallida*

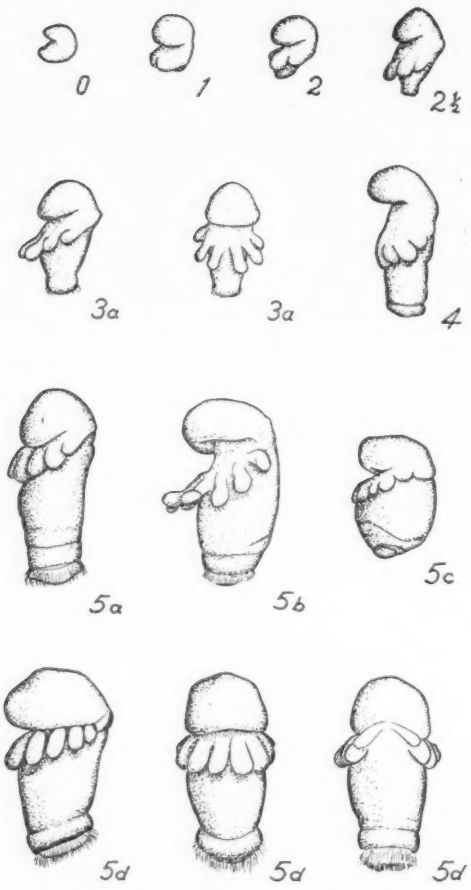


Fig. 3. *Actinotrocha pallida*. Series of stages from that devoid of tentacles to those with 5 pairs of tentacles. Figure at each stage shows number of tentacle pairs; "1/2" indicates pair of tentacles still incomplete; letters after figures indicate same or different specimens. Stage 3a in lateral and ventral view, stage 5d in lateral, ventral, and dorsal view. Stage 3a shows characteristic shape at floating, stage 5a shape at rushing movement. Stage 5c demonstrates extreme contraction. Stage 5d old photonegative specimen. 60 ×.

was indicated by the correspondence between the muscle formula of the just metarmophosed form according to SELYS-LONGCHAMPS and that of this adult (SILÉN 1952, p. 131). This assumption is now confirmed by the connection of the larva with the ova shed by the adult in question as well as by the result of its metamorphosis (cf. below).

A. pallida is previously reported from Heligoland and once from the Channel (SCHNEIDER, SELYS-LONGCHAMPS, CORI 1939, p. 163).

Its earliest appearance observed in the Gullmar area is July 20 (specimens still devoid of tentacles). Then it occurs regularly and fairly abundantly in the

VOL. 35 1954

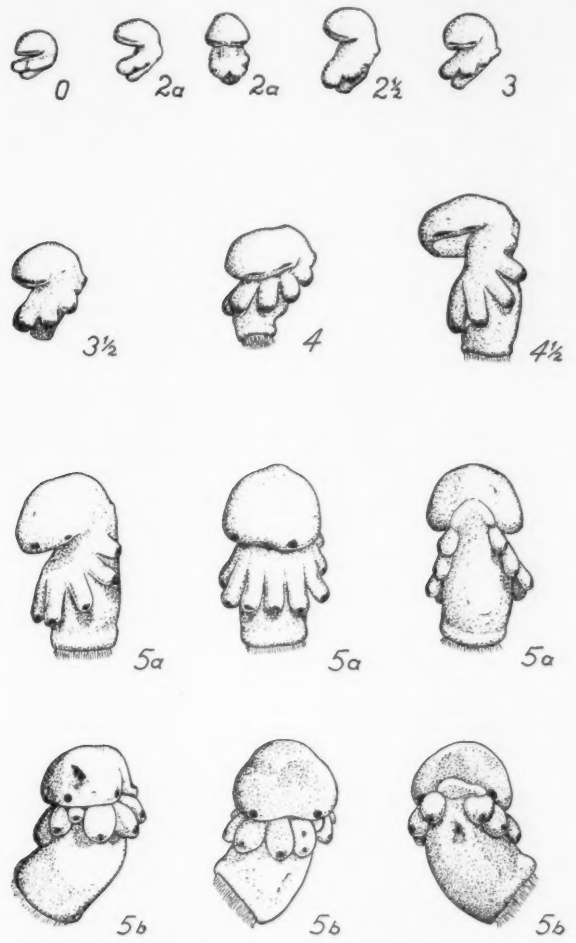


Fig. 4. *Actinotrocha hippocrepia.* Series of stages from that devoid of tentacles to those with 5 tentacle pairs. Figure at each stage shows number of tentacle pairs; "1/2" indicates pair of tentacles still incomplete; letters after figures indicate same or different specimens. Stage 0 just released from tentacle crown. Stage 2a in lateral and ventral view, stages 5a and 5b in lateral, ventral, and dorsal view. Stage 5b old photonegative specimen. Origin and concentration of pigment spots seen. 60 ×.

plankton until December 15 at least, with a maximum in September. Its appearance thus coincides intimately with that of *A. branchiata,* which according to SELYS-LONGCHAMPS is the case at Heligoland as well.

3. ***Actinotrocha hippocrepia,*** new technical name. Fig. 4.
? *A. pallida,* Schneider 1862, *partim.*
Larva of *Phoronis hippocrepia,* Str. Wright 1856.

This larva agrees closely with *A. pallida* in its general appearance and behaviour.

It is definitely though little longer than the latter, the larva ready to metamorphose attaining a length of 0.7 mm. It is, in addition, somewhat slenderer and more translucent and is quite a light shade of brown. The maximum number of tentacles is 5 pairs as in *A. pallida*. The form differs from the latter in possessing two sanguinary globules, which fuse in the oldest specimens. Taking only these characters into consideration, however, the form is difficult to distinguish with certainty from *A. pallida* unless the two types are placed side by side.

Fortunately, however, *A. hippocrepia* is provided with one distinct and objectively discernible character, its pigmentation, which seems to be unique among the Actinotrochae. The very small pigment grains are a dark brown in reflected light. They are not contained in amoebocytes but diffusely assembled (in cells of the epidermis?) at certain fixed points of the body. Even in the quite young larva with two pairs of tentacles developed or about to develop, is seen a faint dark strip along the ventrolateral margin of the hood; it is interrupted in the ventromedian line. The strip increases in width and darkness during the further development, its ventral interruption widening simultaneously. When the larva reaches the stage with 4 pairs of tentacles each half of the strip is split up into two. The four short strips that have thus arisen go on concentrating during the stage with 5 tentacle pairs and finally form four circular, distinct patches. During the stage with 3 tentacle pairs diffuse aggregations of the same dark pigment begin to appear on the points of the tentacles. They gradually concentrate and in the oldest specimens with 5 tentacle pairs they form clearly defined spots with a restricted area of diffuse pigment round them. — Though quite distinct when once observed these pigment patches are not more striking than that the present author perceived them the first time only when one day an unusually large number of the larva turned up in the plankton.

Of the larvae previously described that might be connected with *Ph. hippocrepia*, *A. hatscheki* and *A. ashworthi* (SELYS-LONGCHAMPS 1907, pp. 193 ff.) are directly excluded, inter alia owing to their large number of tentacles, from being identified with the present larva though they are of the small, "compact" type common to *A. pallida* and *A. hippocrepia* as described here. *A. sabatieri* is of the same general type and the number of its tentacle pairs is given as maximum 6. It thus closely resembles *A. hippocrepia* (and *A. pallida*). Here there is a real though small possibility that pigment spots really present have been overlooked and that the larva may be identical with *A. hippocrepia*. However, as long as the reasons for connecting it with *Ph. psammophila* — *Ph. sabatieri* have not been shaken such an identification seems impossible.

VOL. 35 1954

The frequent occurrence of *A. hippocrepia* together with the similar *A. pallida* suggests that it may earlier have been confused with the latter.

In this connection another fact must be stressed. The Gullmar Fiord specimens of *Ph. hippocrepia* now discussed resemble the form considered by SELYS-LONGCHAMPS as the separate species *Ph. gracilis,* and the identification of the present larva as that of *Ph. hippocrepia* thus depends on the identification of *Ph. gracilis* with *Ph. hippocrepia* made by the present author (1952, pp. 134—135, etc.).

In the Gullmar Fiord, specimens of *Ph. hippocrepia* were found to liberate their larvae during August, and in the plankton the larva was obtained exclusively in the second half of this month and in September. This period is thus considerably more restricted than those of *A. pallida* and *A. branchiata* but can be said to agree with the latter in so far that it coincides with their culmination. The larva occurs regularly but is somewhat sparser than *A. pallida.*

METAMORPHOSIS OF THE ACTINOTROCHAE.

The peculiar metamorphosis of the Actinotrocha larva has been studied by several authors (cf. SELYS-LONGCHAMPS 1907, p. 151, and CORI 1939, pp. 58 ff.). However, it is a striking fact that metamorphosed specimens have been obtained only occasionally. Though a little more common, even half-metamorphosed specimens that do not succeed in completing the metamorphosis, are rare. SELYS-LONGCHAMPS (1903, pp. 39—40) describes how, in *A. branchiata,* he obtained metamorphosis only of a few specimens ("wenige pro 1000") and then exclusively of mature ones just fished or up to, at the most, one day after their capture. It is to be observed that the larvae were evidently kept in clean jars. This coincides well with my own experience of *A. branchiata, A. pallida,* and *A. hippocrepia.* VEILLET (1941, pp. 1—2) met with the usual difficulty to obtain metamorphosis but succeeded in provoking it by artificial means. When the provisory tentacles of a mature larva are cut, sufficient stimulation is obtained to cause the contraction of the body muscles necessary to bring about the evagination of the metasoma. BROOKS & COWLES (1905, p. 99) appear to have caught a glimpse of the real background of the problem as they tried, though in vain, "to make the conditions favourable for the completion of the metamorphosis" by adding sand to the dishes containing the larvae, etc.

As is well known, the pelagic larvae of at least several marine groups depend on the presence of a more or less specific substratum for performing their metamorphosis (cf. for instance THORSON's survey 1952).

The Actinotrochae now discussed were studied by the author in this respect, mainly by the addition of the substrata inhabited by the corresponding

adults. Whereas the case of *A. branchiata* is quite clear and instructive, those of *A. pallida* and *A. hippocrepia* are more intricate. Therefore, the following account of the metamorphosis conditions will begin with the former type.

As described above (fig. 2), the mature *A. branchiata* is easily recognized by its being opaque, possessing about 16 pairs of larval tentacles and below them a row of definite tentacles, and by its hood being contracted with a sharply protruding sensory organ.

The metamorphosis is easily and infallibly brought about by introducing some of the clay-mixed sand in which the adults are found, to a bowl containing such a mature specimen.

The mature *A. branchiata* moves slowly along in the way described above for younger stages but, in contradistinction to the latter, it moves chiefly along the bottom of the clean finger bowl: it has become photonegative. When a portion of the suitable substratum is added, the behaviour of the larva suddenly changes. It is activated, its speed increases, and it becomes more determined in its movements. It drives towards the substratum, sweeps along it for a bit, stops for a moment, circles about, runs straight along again, suddenly rushes upwards and runs along in the upper water layers, dives again, etc. This series of photonegative testing phases and photopositive phases may be repeated two or more times. All the time the sensory organ shoots out and in at irregular intervals from the permanently contracted hood. Finally, generally within one hour but sometimes up to three hours, the larva dives vertically, without turning round its longitudinal axis, its body stiff, its hood somewhat raised, and the sensory organ protruding into a sharp point, driven by the preanal trochus working intensely as a propeller (fig. 5). It hits the substratum point and hood first and is driven slowly into it. At first its body is still straight, but when part of it has entered the substratum it curves slightly towards the dorsal side and consequently then proceeds along a curved path so that, when fully entered, it is situated horizontally somewhat below the surface of the substratum, its ventral side downwards. Now the metasoma evaginates vertically downwards. The larval organs are disengaged and the distal ones of them swallowed, the body portion mouth-anus is shortened, and a tube is secreted, all of which events leading to the structure characteristic of the adult have been described in detail by earlier authors. The occurrences from the last dive of the animal to the completion of the metamorphosis take place within a few, usually about ten minutes.

With the method described it was possible to obtain metamorphosis also in larvae caught in a far from mature stage (from the stage with 11 tentacle pairs and upwards) and then reared in the laboratory.

The fully mature larvae are able to live on unchanged for a considerable time, up to 3 weeks at least, if the suitable substratum is withheld.

VOL. 35 1954

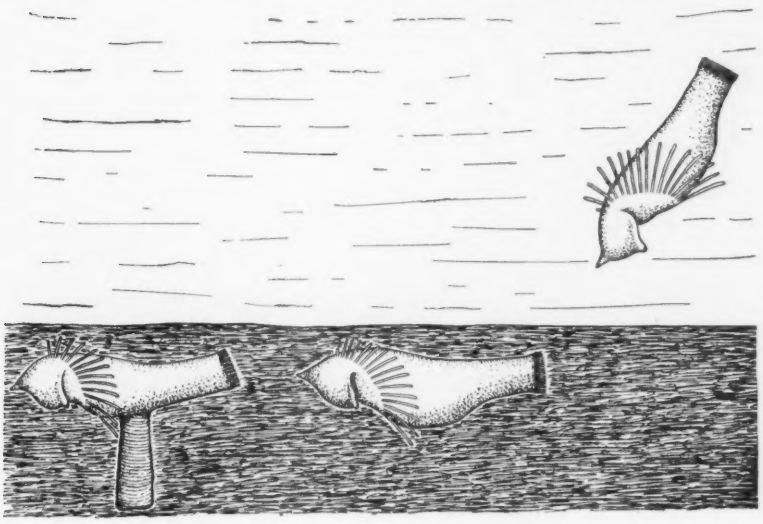


Fig. 5. *Actinotrocha branchiata*. Slightly diagrammatic sketches from life combined to show settlement in soft substratum and (left) beginning metamorphosis. Hood somewhat raised so projecting sensory organ points almost straightly forwards.

Whenever this substratum is added during at least the first 10 days of the period, the metamorphosis is performed immediately and normally.

Metamorphosis failed to appear only in quite a few mature specimens of *A. branchiata* given the adequate substratum. All of them exhibited some irregularity or other indicating an abnormal constitution. In two of them the irregularity shown seems significant. One of the two sanguinary globules normally situated to form a pair was situated far distally of the normal place. This deficiency was observed at once after capture and the question arose if they could metamorphose: as is well known, the lophophore vessel of the adult is formed by the fusion of the two globules and it appeared problematic that they could do so in these specimens considering their wide separation. They did not metamorphose in spite of the most careful treatment for many days.

It was said above (p. 233) that *A. branchiata* is sometimes seen to metamorphose in immediate connection with its capture, mostly in an abnormal and incomplete way. The present author observed the same thing on two or three occasions in *A. pallida* as well but never in *A. hippocrepia*. One might draw the conclusions of VEILLET's observations and state that the coarse handling of the larvae in the plankton net is a stimulation strong enough to bring about a contraction of the body muscles and a subsequent evagination of the metasoma. However, in view of the facts that *A. branchiata* and *A. pallida* depend on the presence of a mud-sand substratum and *A. hippo-*

crepia on a calcareous substratum for their metamorphosis (cf. further below) and that the two former metamorphose in the circumstances described but the latter not, a more natural provisory explanation appears to be that the plankton and detritus baked together by the plankton net offer a substratum that is not quite satisfactory but sufficient (in combination with the strong mechanic stimulus?) to cause the two mud-sand-living forms to metamorphose, though generally abnormally. THORSON (1946, pp. 154 and 465) found two young specimens of *Ph. mülleri* — one of them abnormal in the present author's opinion — that had metamorphosed in the detritus amassed in a bottle-collector, a fact that points in the same direction.

Several larvae that had made a halfhearted attempt to metamorphose when captured were kept in finger bowls for a considerable time. They remained alive for some days but never completed their metamorphosis. Even an addition of the adequate substratum had no effect. It seems that the metamorphosis must be performed completely when once begun or else the larva perishes.

The mature *A. pallida* or *A. hippocrepia* are, unfortunately, difficult to distinguish from other old but still immature stages of the same forms. No changes of the general appearance take place. The final number of 5 pairs of larval tentacles is reached long before maturity. The definitive tentacles develop after the metamorphosis. In fact, the behaviour offers one single distinguishing character: the mature larvae are photonegative. And this character cannot be relied upon as only a few specimens show an extreme permanent photonegativity.

The larvae that could be assumed with any probability to be mature were given doses of the substrata inhabited by their respective adults, in the case of *A. pallida* clay-mixed sand, in the case of *A. hippocrepia* pieces of Lithothamnion or mollusk shells.

In both cases many specimens, presumably the really mature ones, were clearly activated in the same way as was described above for *A. branchiata* though with far less intensity. In *A. pallida* the metamorphosis occurs in the same way as in *A. branchiata,* the larva taking a horizontal position, its ventral side downwards, close below the surface of the loose substratum, and then evaginating its metasoma sac. *A. hippocrepia* does not enter the substratum straight away. The exploratory movement of the larva ceases and it comes to a standstill, its ventral side parallel with and close to the surface of a piece of lime (fig. 6, above). Then the metasoma sac evaginates and the first small worm body is formed, erect and wholly outside the substratum. More often, however, the larval body is not raised by the evaginating metasoma but pushed aside along the surface of the substratum, so that the worm takes a horizontal position (fig. 6, below). In nature, the tubes of the adult animals are usually seen to issue from fissures and hollows in the substratum, a fact indicating

VOL. 35 1954

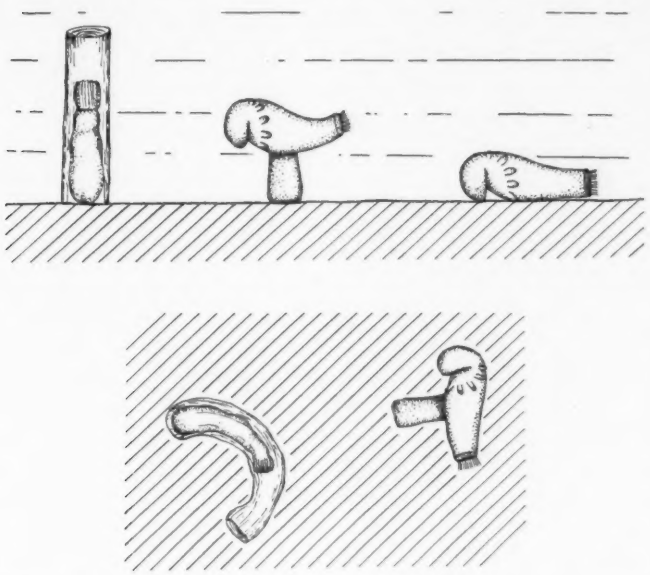


Fig. 6. *Actinotrocha hippocrepia.* Slightly diagrammatic sketches from life combined to show settlement and metamorphosis on hard calcareous substratum. Above: case 1 in lateral view; larva is raised by evaginating metasoma, tube and adult consequently erect. Below: case 2 seen from above; metasoma evaginated in horizontal plane, tube and adult consequently adnate.

that the larvae prefer such irregularities to the smooth substrata that it proved necessary to offer them in the present experiments in order not to lose sight of them. The worm is immediately surrounded by a thin tube. Only then does the animal begin to burrow into the lime piece, into which it soon disappears altogether. The larva obviously lacks the ability to burrow possessed by the adult. In both forms the real metamorphosis seems to take place in about the same short time as in *A. branchiata,* 15 minutes or so.

In *A. pallida* as well as in *A. hippocrepia* the author only succeeded in causing very few specimens to metamorphose, about 10 per cent of the total number treated with the adequate substrata and about 20 per cent of those distinctly activated by the substrata.

Various methods were employed in order to obtain a more general metamorphosis. As it seemed possible that *A. pallida* is affected by some special component of its substratum, the latter was coarsely fractioned into its mud and sand components but neither of them gave a better effect. *A. hippocrepia* was clearly but not very much more activated by the addition of a small dose of calcium chloride, calcium presumably being a factor of some effect. In finger bowls containing these larvae were placed specimens of their respective adults together with the normal substratum in order to find out if an aggregation

principle had some influence (cf. KNIGHT-JONES 1951) but no effect was observed. Darkness did not improve the result.

One might argue that, in fact, all of the really mature larvae metamorphosed and that the meagre result is due to a confusion of mature and immature specimens, which is easily done here but not in *A. branchiata*, as demonstrated above. Still, the suspicion lingers that the release of the metamorphosis demands some very special property in the substratum that was not revealed, whereas *A. branchiata* is less pretentious in this respect. That such special demands exist in the case of various larvae, possibly to an extent not yet fully revealed, was demonstrated by, for instance, JÄGERSTEN (1940) and WILSON (1953, etc.).

The author has observed the adult *Ph. hippocrepia* to burrow in limestone (Plymouth, England) and Litothamnion (Gullmar area), and THÉEL (1907) and SELYS-LONGCHAMPS (1903) have reported it from shells of dead mollusks. In the Mediterranean a form considered to be identical with this species does not burrow at all but forms crusts outside the hard substratum. This might be interpreted to indicate that the species is but little pretentious. However, SELYS-LONGCHAMPS mentions that he found it only in very few, hardly one per cent of the shells examined. And on the Swedish west coast the present author found it in very few of the Litothamnion crusts examined; close by crusts inhabited by it were obtained crusts devoid of it but otherwise indiscernible from the former. These facts may be interpreted to show that in addition to the fundamental demand represented by a calcareous substratum the species demands some special property of the latter, certain hydrographical conditions concerning the velocity of the water movement, etc., or the like.

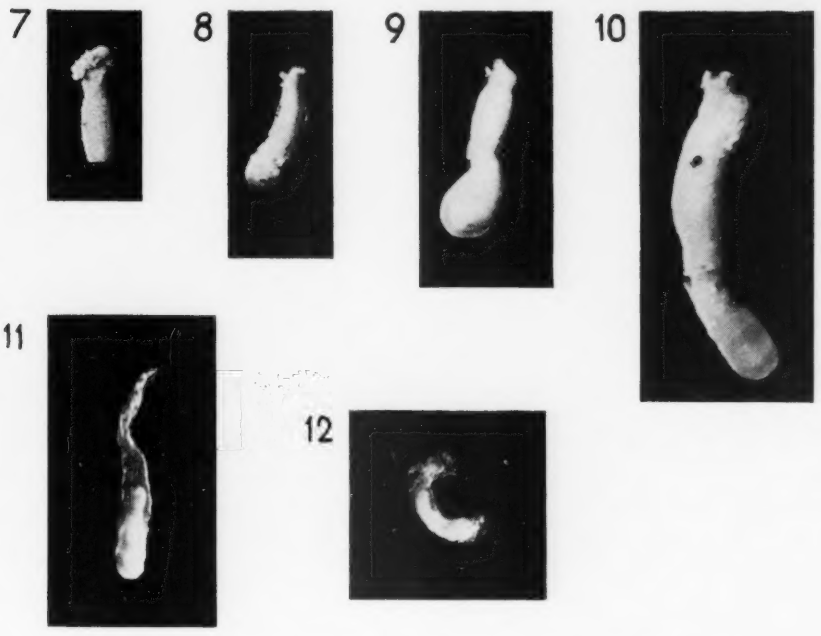
Nothing can at present be stated in this respect for *Ph. pallida*. The clay-sand substratum inhabited by it is so hard that a Petersen grab cannot be used for its collection. A ring dredge must be employed and the clay-sand is so jumbled together that all traces are effaced of possibly existent patches or pockets of a special substratum preferred by the species.

The length of the worm resulting from the metamorphosis averages that of the mature larva in all three species.

In *Ph. pallida* and *Ph. hippocrepia* the tube from the very beginning exhibits the structural features characteristic of the tube of the adult.

GUSTAFSON (1936) commented upon the difficulty of reconciling the structure of the proximal tube end of *Ph. mülleri* with the mode of growth of the animal. The animal grows in the proximal direction. The proximal tube end of this species is closed, however, save for a minute central pore. In this connection it is of interest to note that the tubes of the young specimens reared from larvae are open proximally during at least the first two weeks after the metamorphosis. The further development of the tube was not ob-

VOL. 35 1954



Young phoronids obtained by metamorphosis of Actinotrochae. 11 ×.

Figs. 7—10. *Actinotrocha branchiata—Phoronis mülleri.* Fig. 7. 1/4 hour after beginning of metamorphosis. Metasoma sack fully evaginated. Anal papilla to the right. Tube not yet formed. Fig. 8. 1 hour old. Posterior end rounded. Anal papilla to the left. Tube formed but adhering sand grains removed. Fig. 9. 1 day old. Ampulla distinct. Tube removed. Fig. 10. 5 days old. Tube removed.—Fig. 11. *Actinotrocha pallida—Phoronis pallida.* 7 days after metamorphosis. Because of removal from substratum immediately after metamorphosis no sand grains are incorporated in tube.—Fig. 12. *Actinotrocha hippocrepia—Phoronis hippocrepia.* 7 days after metamorphosis. Adnate type.

served. In spite of this incompleteness, one is tempted to assume, in these circumstances, that the tube remains open proximally until the animal has reached its final size. If so, all specimens with proximally closed tubes are full-grown despite the considerably varying sizes found among them.

The animals obtained at the metamorphosis of the respective forms of larvae are, from the very first, tentatively recognizable as to species, and within 4—5 days they exhibit in full the characteristics of the adults (cf. figs. 7—12). The conclusive features are the composition and shape of their tubes, their external morphology, their anatomy—in particular the characteristic muscle formulas—as demonstrated in thin sections, etc. The identifications of the young animals with the various adult species thus performed confirmed the identifications of the various larvae arrived at in the rearing experiments. The picture of the life cycles of the three species discussed is complete.

LARS SILÉN

DEVELOPMENT OF *PH. OVALIS*.

A study of the sexual reproduction meets with even greater obstacles in *Ph. ovalis* than in *Ph. hippocrepia*. To the lime-burrowing and "colony"-forming habits in common with the latter are added the difficulties inherent in its small size and in the fact that the sexual activity and a considerable part of the development takes place wholly within the hard substratum.

It follows from the latter fact that the observations concerning the early stages of the reproduction must be performed, largely, on dead material. Shells inhabited by the species were fixed, decalcified, and then dissected under the preparation microscope. In this way was collected a series of stages so complete that a fairly good picture of the early reproduction biology could be formed, a picture completed and controlled by fragmentary observations on the living animal.

The free larval stages were obtained in the following way. During the suitable season a great many old *Cyprina* shells apparently suited for the species (cf. SILÉN 1952) were collected. They were broken into pieces and their broken margins were scrutinized under the preparation microscope. If they were inhabited by groups of *Ph. ovalis* in the right stage of reproduction, this condition was revealed by glimpses here and there of tubes containing embryos. Such shell pieces were placed in jars with sea water. The shells were removed into jars with fresh sea water two or three times a day and the "old" jars were ransacked for larvae. In this way hundreds of larvae were easily obtained. When particularly numerous larvae were found to escape from a shell, the surface of the latter was investigated until the tube mouths were found through which the larvae were liberated, and the mode of liberation was then studied. The larvae were reared in finger bowls. The rearing, which is so difficult a task in other phoronids, offered no problems here. Partly at least this depends on the *Ph. ovalis* larvae being lecitotrophic.

It should be stressed that in the present paper will be related only the main, largely superficial features of the embryo development of interest for the understanding of the biological occurrences.

The sexual reproduction of *Ph. ovalis* is almost wholly unknown save for a few remarks by the present author in a previous paper (SILÉN 1952, pp. 127 ff.).

According to MARCUS (1949) testes appear in March, ovaria in July, in material from Brazil.

In the Gullmar area testes and ovaria are often found in the beginning of August. They grow considerably during September and October but spawning was only found in November, thus considerably later than in the other three species of the area. Whereas the latter largely occur at the small depth of

VOL. 35 1954

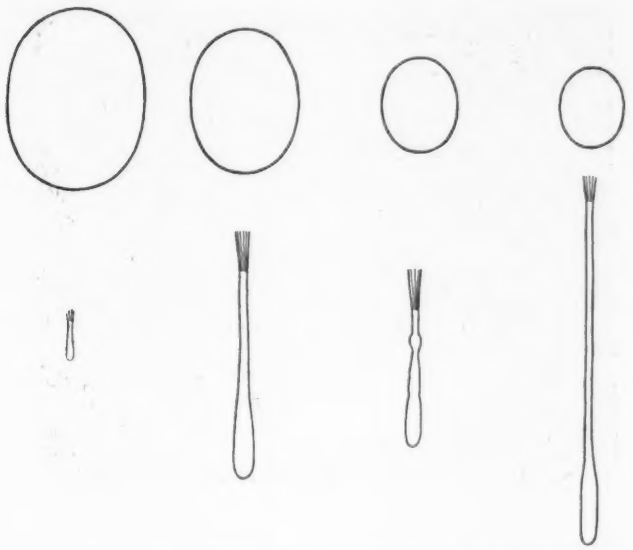


Fig. 13. Egg size and medium body size in (from the right) *Phoronis mülleri, Ph. pallida, Ph. hippocrepia, Ph. ovalis.* Ova 150 ×, animals natural size. (From SILÉN 1952.)

1—15 m, *Ph. ovalis* was not obtained above 25 m in the area. It is true that this difference in habitat might be expected to result in a later onset of the breeding in *Ph. ovalis,* provided this species were a varm-water spawner as the other three obviously are: the summer warmth reaches the deeper water layers inhabited by *Ph. ovalis* later. However, this fact evidently does not suffice to explain so great a difference in spawning time as that really existing. *Ph. ovalis* is not a warm-water spawner. No study of the state of its environments during the spawning was made.

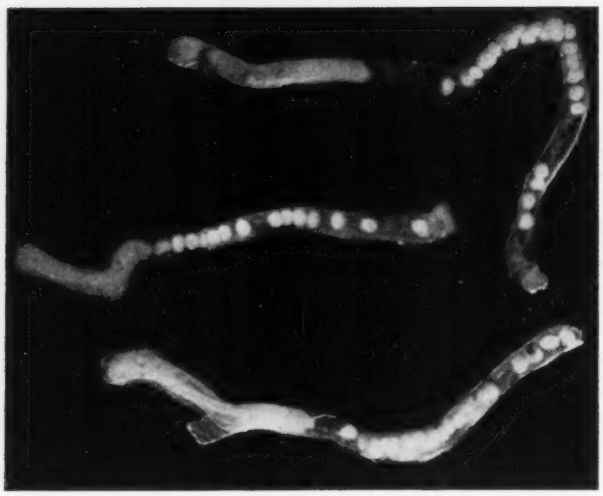
Ph. ovalis, too, is possibly a simultaneous hermaphrodite to judge from about the same (though even a little more meagre) evidence as that described above for *Ph. hippocrepia.*

All of the ovocytes develop simultaneously. They also leave the ovary simultaneously. They are then arranged into two longitudinal rows in the body cavity, which they occupy completely owing to their large size, even expanding the body wall to give the specimens ready to spawn a swollen appearance. Their number averages 40.

The diameter of the ovocytes free in the body cavity as well as of the just shed eggs averages 125 μ.

As the ova of the phoronids without brood protection (*Ph. pallida, Ph. mülleri,* etc.) average 60 μ in diameter, those of forms with brood protection in the tentacle crowns (*Ph. hippocrepia,* etc.) 100 μ, their quite unusual size in the dwarf form *Ph. ovalis* led the author from the beginning to suspect this

14



Phoronis ovalis. Tubes containing eggs and embryos.
Fig. 14. Tubes with contracted animal to the left and embryos to the right. 12 ×.—Fig. 15. Tube containing one uncleaved egg and two-cell stages. 40 ×.—Fig. 16. Tube with retracted animal and blastulae. 40 ×.—Fig. 17. Tube with gastrulae. 40 ×.

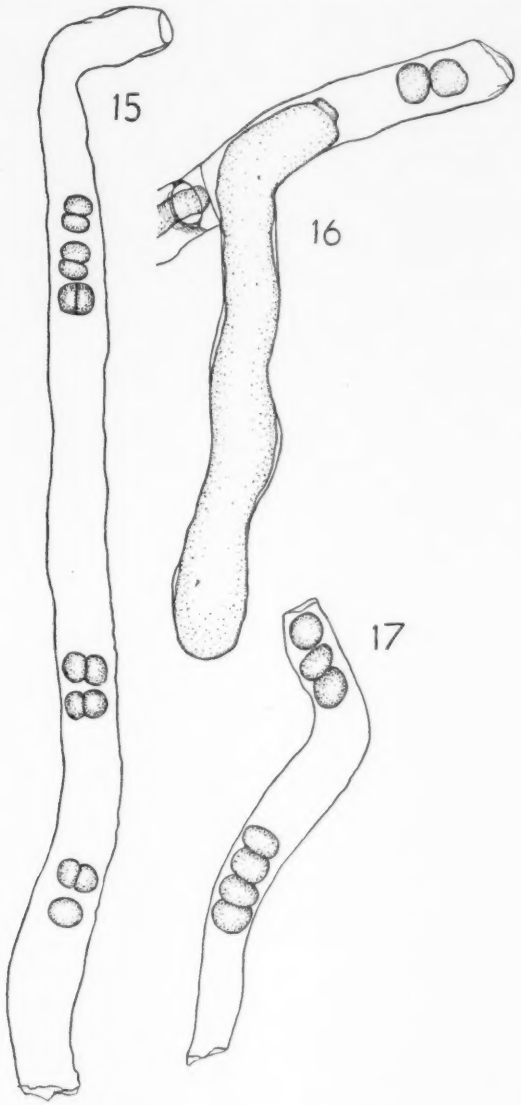
VOL.
35
1954

species to possess some sort of brood protection; however, the type of brood protection in the tentacle crown previously known in the phoronids was evidently excluded owing to the by far too small size of that body portion in *Ph. ovalis.* Considerable deviations from the usual conditions in the phoronids could also be expected in its further development, duration of the pelagic life, etc. (Cf. fig. 13 and SILÉN 1952, p. 128.)

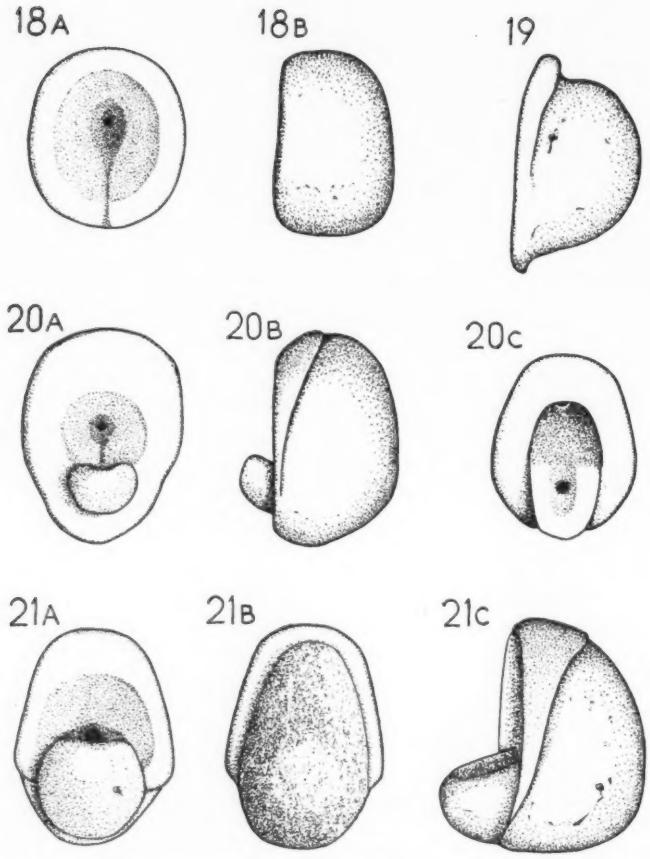
The animal about to shed the eggs retreats in its tube (fig. 14). The eggs are not evacuated through the nephridia as in the remaining phoronids but probably through the terminal opening momentarily formed when the tentacle crown is thrown off. The first eggs are placed in the foremost part of the tube. During the continued egg-laying the animal retreats further until the completely spawned animal occupies the posteriormost 1/3—1/4 of its tube while the anterior part of the latter is occupied by a row of eggs or embryos (figs. 14—17).

All of the members of such an embryo group are at about the same stage of development, representing 2- and 4-cell stages or 4- and 8-cell stages or blastulae, etc. This indicates that *Ph. ovalis* sheds its ova within a very short space of time like, probably, *Ph. psammophila* but unlike the remaining phoronids studied in this respect. This view is supported by the simultaneity in the development of the ovocytes related above.

As a considerable time is required for the development of the embryos in



the tube, it follows that the animal of the tube must remain retracted for the same period. It is of interest in this connection to find that the tentacles of the latter are thrown off immediately before the beginning of the egg-laying and are not regenerated until the embryos leave the tube (figs. 14, 16). It is somewhat surprising that the animal is thus able to survive not only the production of a quantity of eggs (and possibly sperms) amounting to a volume at least



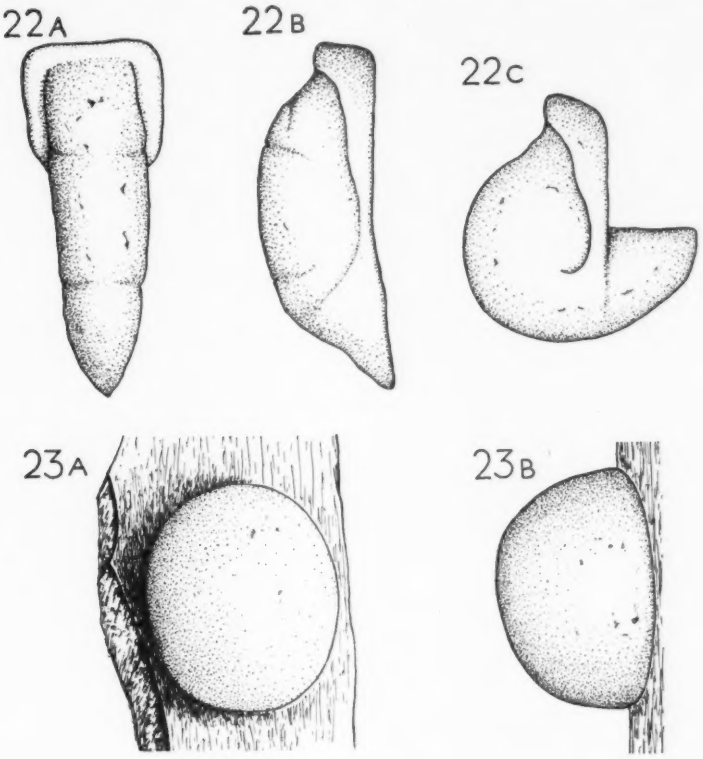
Development of *Phoronis ovalis*. Figs. 18—22 150 ×, fig. 23 200 ×.
Fig. 18. Just escaped larva in ventral and lateral view.—Fig. 19. Slightly older stage in lateral view.—Figs. 20 A and 20 B. Larva 2 days after liberation in ventral and lateral view.—Fig. 20 C, same larva in oblique anterolateral view to show position of mouth (almost hidden) and anus.—Figs. 21 A and 21 B. Larva 3 days after liberation in ventral and dorsal view.—Fig. 21 C, slightly older larva in lateral view.—Figs. 22 A and 22 B. Larva 5 days after liberation, creeping, in dorsal and lateral view.—Fig. 22 C, same larva rolled up after strong stimulation.—Figs. 23. Just attached larva, 7 days after liberation.—Cf. further the text.

equal to the volume of the rest of the animal but even an immediately subsequent period of starvation.

When liberated, the eggs are still uncleaved but the segmentation apparently starts shortly after their release. This is the only evidence concerning the where and when of the fertilization. It does not suffice to settle the question whether the ova are entered by sperms when still in the body cavity as in *Ph. viridis* or after the liberation as described above for other forms.

It was not possible to make any exact observations concerning the duration

VOL. 35 1954



of the development in the tube. The embryo leaves the tube in a stage (cf. below) that is reached by other phoronids in about 2 1/2 days. We must then keep in mind that the present embryos are rich in yolk, a condition that, generally, is known to delay the cell divisions. It follows that we must assume a longer duration of the corresponding development in *Ph. ovalis,* possibly up to 4—5 days.

The embryo leaves its tube in an advanced gastrula stage (fig. 18). It forms an oval, rather high disc about 0.2 mm in length. The central area of its ventral side is somewhat concave. The blastopore is closed save for the mouth, which is situated in the median line a little anterior to the central point. The closed posterior part of the blastopore is indicated as a narrow and shallow furrow, the "raphe" of CALDWELL (1883). The anus has not appeared. The body is opaque and yellowish owing to the amassment of yolk except in its anterolateral margins. Its surface is uniformly ciliated.

The embryos swim slowly up and out of the tube mouth by means of their cilia. They do not rotate nor perform spiral movements. Their swimming power

is feeble and they immediately sink slowly down to the bottom of the jar. The embryos of one tube leave in rather rapid sequence, at intervals of from 2 to 20 minutes, as might be expected from their approximately identical age discussed above. They proceed only very slowly close above the bottom. When a tube is evacuated its embryos consequently form a group outside the tube mouth. Groups of 10 to 27 embryos were observed. After a few hours they have dispersed.

It can be presumed that these conditions observed in the laboratory do not agree with the natural ones. *Ph. ovalis* as well as other phoronids live in places swept by currents on which they depend for obtaining their food. The swimming power of the larvae, slight though it is, makes them very light, so to speak, keeping them almost floating. Even the slightest blow with a pipette makes them whirl round all over the jar in which they are contained. In nature they are certainly swept away directly they appear in the tube mouth and are then kept floating during the whole of the swimming stage.

The larva does not exhibit any definite phototaxis during any of its stages. It can be presumed that it never leaves the water layer near the bottom and, consequently, that the fact that it has never been obtained at the normal plankton fishing in the upper water layers really depends on its absence there.

VOL. 35 1954

Already during the first 24 hours of the free life of the larva a distinct rim appears along its anterior margin (fig. 19). On the second day it is further developed (fig. 20). The anterior portion of the larva grows, so that the mouth acquires a central position in the ventral side (fig. 20 A). Furthermore, a blunt outgrowth is formed around the posterior end of the raphe. On the anterior, excavated face of the projection the anus is now seen (fig. 20 C).

The subsequent development is characterized, generally, by a further growth in size, and, specifically, by the strong prolongation of the ventral prominence as well as by the further extension and differentiation of the anterior rim into a horizontal frame enclosing the anterior two thirds of the body and contrasting in its colourless transparency with the yellowish, compact bulk of the latter (fig. 21).

During the 4th day the larva is still swimming freely, its ventral prominence pointing downwards at an angle with the body. During the 5th day it shows tendencies to adhere now and then to the substratum, straightening the ventral prominence backwards and giving off a mucous secretion from its ventral side.

Towards the end of that 5th day the larva definitely abandons its pelagic life (fig. 22). The now long prominence has grown to form a direct posterior continuation of the body, which glides along the substratum like a turbellarian, its ventral side downwards and its anterior rim expanded. The locomotion is brought about by ciliar movement combined with a plenteous secretion of mucus. Muscular action seems to be of little importance, contractions of parts

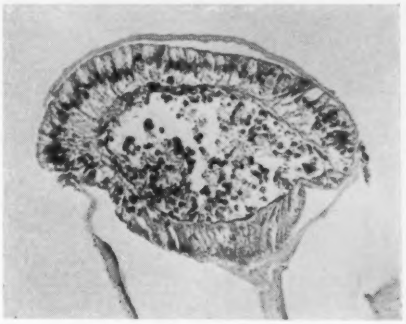


Fig. 24. *Phoronis ovalis.* Median section of larva attached since 12 hours. Gut as well as closed mouth and anus are seen. Secreted cover and its attachment to decalcified and therefore fragmentarily appearing substratum seen. 300 ×.

of the body occurring only when the direction of the progress is altered. Strong stimulations are required to make the larva leave the substratum even momentarily and curve into the original shape; the swimming activity does not start again.

This creeping stage continues during the whole of the 6th day.

As it was suspected that the creeping habit represented an exploratory movement prognosticating an imminent settlement of the larva, the substratum typical of the adult, i.e. pieces of old *Cyprina* shells, was added during this stage to the bowls containing the larvae.

On the 7th day (seldom on the 8th) after liberation the settlement takes place.

The larvae show a definite preference for the pieces of shell. Even when very few and small pieces are placed in the bowl the larvae concentrate on them. Only in one case was a larva observed to attach to the glass bowl itself. The larvae seem to attach as readily to the lower sides as to the vertical and upper surfaces of the substratum.

The settlement simply takes place by the larva stopping its creeping progress, its ventral side becoming attached to the substratum. In about one hour its exterior is considerably transformed. All external differentiations are smoothed out and the body forms a hemisphere (fig. 23).

From its appearance one could hardly guess that this body is a just settled Phoronis.

Its intimate structure likewise shows but little of the characters of the adult Phoronis (fig. 24). It has secreted a thin film which completely surrounds the upper, convex side of the body and is attached to the substratum along the periphery of the fixation area; the lower side, attached to the substratum, forms no film. The film obviously corresponds to the tube of other phoronids. No cilia are now to be seen. The epidermis of the convex side is high and very rich in glands. The epidermis of the lower side is likewise high but contrasts with the former in being much denser and in possessing unicellular

glands containing much finer granules. At the anterior and posterior parts of the border line between the two types of epidermis the latter is quite low within a narrow strip. In this way two restricted depressions are formed. The anterior and posterior extremities of the gut nearly reach these points. They are the closed mouth and anus. Inside the epidermis the body is occupied by a compact mass of cells. The by far larger part of it is the still solid gut rich in yolk. The mesoderm is inconsiderable. It has apparently only just begun to form.

In *Ph. ovalis* the transformation and differentiation of the larva into the adult obviously does not occur in connection with its settling as in all other phoronids. What corresponds to the metamorphosis in the latter is here a drawn out development occurring after the settlement. Its further details do not fall within the scope of the present paper.

The *Ph. ovalis* larvae often settle in a number of two or more on the same shell. They do not avoid shells already inhabited by the species. Among other things, it may be noted in this connection that creeping as they are (in their later stages) they do not risk being drawn into the feeding currents caused by the adults. It follows that the entire population of *Ph. ovalis* in one shell does not necessarily represent one "colony" formed by asexual propagation from a single larva but may consist of two or several "colonies". This fact can be demonstrated by means of an extremely cautious dissection of a decalcified shell containing the species. It is then seen that the Phoronis tubes are continuous for often long distances but that a line is often reached where a new group of interconnected tubes is encountered which is free from the former group. The separate groups are often difficult to discern as they may be intricately interwoven in the boundary area.

It follows from the observations related above that the total time elapsing between the liberation of the ovum and the settling of the larva averages 11—12 days in *Ph. ovalis*. Some uncertainty attaches to the estimation of the duration of the protected period. Even if it is longer than was argued above, the total period nevertheless does not by far reach the length, 18—21 days, reported above for other phoronids. The difference as regards the pelagic stages in the respective cases is particularly striking, 4 days as compared with 14 (*Ph. hippocrepia*) or 21 (*Ph. pallida, Ph. mülleri*) days.

The larva of *Ph. ovalis* is so utterly unlike those characteristic of all other phoronids that it cannot be called an Actinotrocha. Nevertheless, certain traces of that type of organization can be found in it. The convex dorsal portion with its marginal rim is differentiated in a way demonstrating its correspondence to the hood of the Actinotrocha. The ventral prominence, in the creeping stage forming the posterior body portion, can be concluded to correspond

VOL.
35
1954

to the soma of the Actinotrocha as shown by its relations to the dorsal portion as well as by the situation of the anus.

Thus, whereas in the Actinotrocha the hood appears almost as an appendage to the well differentiated soma, the corresponding structure represents the very bulk of the larva of *Ph. ovalis,* on which the soma is a poorly differentiated projection only.

Whereas all Actinotrochae are planktotrophic the *Ph. ovalis* larva is wholly lecitotrophic. It leaves the brood chamber in a much less differentiated state than do the larvae of other brood-protecting phoronids of the *Ph. hippocrepia* type. Its free life serves its distribution excusively, not its nourishment. The first, pelagic stage represents a period of general dispersal, the second, creeping stage a period of detailed exploration. The formation of a special pelagic larva is almost wholly omitted and a metamorphosis in the general sense of this term is consequently excluded. The settling occurs before the differentiations specifically leading to the adult type have begun.

DISCUSSION.

During, above all, the last two decades many conditions and rules have been revealed concerning the reproductive and developmental biology of marine animals. THORSON has given excellent surveys of them in his papers of 1950 and 1952. When no special references are given below the reader is referred to these surveys, where numerous references are given.

Considering the relative uniformity of the few species constituting the group Phoronidea one might be led to expect a uniformity in their propagative conditions. Several features related above show, however, that considerable variations in this respect exist among them.

As regards the sexual conditions at least two divergent types can be discerned. One is represented by *Ph. viridis,* which is probably dioecious or at least decidedly proterandric, the other by *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* (possibly *Ph. hippocrepia* and *Ph. ovalis* as well), which are simultaneous hermaphrodites with the possible restriction that eggs and sperms are not liberated exactly at the same moment.

In *Ph. viridis* foreign sperm enters the body cavity and the ovocytes contained there. In *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* (possibly also others) the ova are entered by the sperm just after leaving the body cavity. In the latter case a very short time, probably less than an hour, elapses between the entrance of the sperm and the fusion of the male and female nuclei, in the former a considerable period of unknown duration must be assumed to separate these occurrences.

May it be that the "viridis-type" is characteristic of dioecious phoronids, the "pallida-type" of hermaphroditic ones? This problem cannot be solved as long as the sexual conditions are unknown in other phoronids. — No correlation was found between the sexual conditions and the type of development of the embryo.

The egg sizes are different in different species. They can be grouped into three types: *Ph. pallida, Ph. mülleri, Ph. architecta,* and *Ph. viridis* have an egg diameter averaging 60 μ; *Ph. hippocrepia* and *Ph. australis* 100 μ; *Ph. ovalis* 125 μ.

There is no correlation between body size and egg size. The body length averages in *Ph. pallida* 25 mm, *Ph. mülleri* 60 mm, *Ph. architecta* 50 mm, *Ph. viridis* 200 mm; *Ph. hippocrepia* 30 mm, *Ph. australis* 100 mm; *Ph. ovalis* 8 mm.

Egg size and egg number seem, at the first glance, to be correlated. In one season one specimen produces in *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* about 500 eggs, in *Ph. hippocrepia* possibly about 100, in *Ph. ovalis* about 40. A similar correlation has earlier been established in some other animal groups. However, it is doubtful if it is really significant in the present case. It may be valid in the first three species. But then it must be kept in mind that *Ph. ovalis* is a very small form. It was not possible to estimate with any exactitude the volumes of the respective species. Nevertheless, so much is quite evident from the measurements of the body length just given if combined with their diameters, that the body volume of *Ph. ovalis* is far less than 1/10 of any of the other species. It appears more realistic to estimate the egg number, not per specimen but per body volume. If the figures thus obtained for the respective species are compared, it is evident that we get fundamentally the same correlation in the first three species as before but that the relative egg number in *Ph. ovalis* amounts to at least the same as in *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* and surpasses that of *Ph. hippocrepia.* The general consideration behind the thesis that the egg number decreases with an increasing egg size in a group of related species is probably that the total production of egg volume averages the same in them. It may be that this is the common rule. If so, however, *Ph. ovalis* is an exception, obviously possessing a relative production of egg volume far surpassing that of its relatives as it is. It seems difficult to avoid this conclusion. It appears even in the simple fact that the fertile *Ph. ovalis,* unlike its relatives, is so stuffed with ovocytes as to make its body wall bulge.

As regards the developmental biology three types can be discerned among the four phoronids examined, a fact favourable for a profitable comparison. On the other hand, it is unfortunate that the number of species is so small that it is not always easy to say how generally valid are the rules discerned in them. The characteristics of these types can be summed up as follows.

Type I. *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* shed their yolk-poor eggs free in the

VOL.
35
1954

water (*Ph. architecta* and *Ph. viridis* are known to do so as well). The fertilized eggs develop into pelagic, planktotrophic, and photopositive larvae, Actinotrochae, their structure greatly differing from that of the adults. Within the Actinotrocha the adult is preformed to such a degree that when the former becomes photonegative and settles, a metamorphosis simultaneously sets in leading within a few minutes to a body largely agreeing with the adult and within a few hours to the definite structure of the adult. The duration of the total development averages 3 weeks, a time identical with the duration of the pelagic life.

Type II. *Ph. hippocrepia* sheds its comparatively large eggs moderately rich in yolk in its tentacle crowns, where the embryos spend the first 4—5 days of their development (a mode of brood protection employed also by *Ph. australis,* etc.). The embryos develop along the same lines as in Type I and are released at or near the stage with two tentacle pairs. Their further development is identical with Type I. The duration of the total development is perhaps one day shorter than in Type I; the pelagic life averages 2 weeks.

Type III. *Ph. ovalis,* unlike all other phoronids, sheds its large eggs rich in yolk in its tubes, where part of their development takes place. They are released as gastrulae, i.e. at a considerably earlier stage than in *Ph. hippocrepia.* They are then pelagic. They are lecitotrophic and do not show any definite phototaxis. Certain exterior differentiations appear slightly reminding of the Actinotrocha but they are inconsiderable and no specific larval type can be said to be formed. Presently they settle. However, settlement does not mean, in this case, that locomotion stops. Only after a creeping period of exploration do they attach definitely. This period can be said to correspond to the photonegative exploration period of the Actinotrochae. A certain transformation of the exterior occurs but as the organisation of the adult is not preformed during the free life, that slight transformation cannot be called a metamorphosis. The latter is a drawn-out process occurring only after the attachment. —The duration of the total development up to attachment averages 12—14 days. Of this time the brood protection period comprises possibly 4—5 days, the pelagic period 4 days, the creeping period 3 days. However, it should be observed that this developmental period until attachment in *Ph. ovalis* only superficially corresponds to the same period in the other species: whereas the adult stage is reached through this development in the latter, a further development after the attachment is required before *Ph. ovalis* reaches the same final stage.

The comparison between these types discloses some correlations beginning with the yolk amount of the egg and extending through the further development.

Eggs poor in yolk are shed freely without any brood protection, the development is indirect with a special planktotrophic and photopositive larva with

a long pelagic life, which preforms the adult organisation so that at the settlement it metamorphoses directly into the adult.

A moderate or great richness in yolk is followed by brood protection. However, there is no correlation between the degree of yolk amount and the duration of the brood protection or the developmental stage reached during it in the way that a rich amount of yolk is followed by a particularly long brood protection period and leads to a more advanced stage of development. In fact, the reverse happens to be the case in *Ph. ovalis* as compared with *Ph. hippocrepia*.

As regards the pelagic life, however, the two categories of species with large eggs form a graded series together with those with small eggs. With an increasing amount of yolk in the egg the duration of the pelagic life (as well as of the total free life, at least in the present case) decreases considerably.

But here the possibilities to fit in the three types in such graded series stop.

The extra amount of yolk in the *Ph. hippocrepia* egg only suffices to make a brood protection period (of restricted duration) possible, and the general circumstances make it appear probable that the brood protection here exclusively serves to shorten the hazardous pelagic life, in particular by withholding the embryos from it during their young and most vulnerable stage. In the subsequent development this type does not differ from the forms with small eggs.

Ph. ovalis, on the other hand, exhibits in full the characteristics of the forms with eggs really rich in yolk: the development includes a short pelagic life of the embryo, which is lecitotrophic, does not adopt a special architecture adapted to that life, and shows no definite phototaxis. This is not far from a direct development.

In this species it is seen in an instructive way how three main facts are connected with the shortening of the pelagic life. (1) The brood protection habit. (2) The elimination of the pelagic larva. This means that the embryo escapes the loss of material (energy) consisting in the construction of special larval organs as well as in the necessity to move about and to catch and assimilate the nourishment. (3) The postponement of the organisation of the adult body till after attachment.

The short pelagic period of this larval type serves its dispersal exclusively.

There is a correlation not only between egg size and duration of the pelagic life but also between egg size and the total space of time between spawning and attachment of the larva, as seen from the above. However, this condition seems to be of but little consequence for two reasons. It could be of real importance only if this time represented, in all the species, the total time of development from ovum to adult, but we have seen that this is not the case in *Ph. ovalis*: a great part of the differentiation occurs after the attachment there, and, in fact, the total duration of its development is at least as long as

VOL.
35
1954

in the other species. Furthermore, this total period exhibits wide variations in species with large eggs belonging to different groups of animals.

Fairly exact figures were given above concerning the duration of the pelagic life of the Actinotrochae. However, we must then bear in mind the fact that the duration of that period certainly varies considerably in nature. Actinotrochae kept in finger bowls are able to live for days and weeks without developing further, probably owing to an unsufficient food supply. They are so tough that they are, generally, among the last surviving animals in the plankton samples. These simple observations indicate that the Actinotrochae are well able to endure lack of food and other unfavourable conditions certainly often appearing during their pelagic life. They can "wait for better times" but their development is delayed, of course.

The conditions surrounding the settlement of the Actinotrochae agree in a characteristic way with those discerned in several other marine larvae: the change from photopositivity into photonegativity, the exploratory movements, the ability to prolong the pelagic period if a suitable substratum is not available, the dependence on a special substratum for settlement and, in connection with it, the metamorphosis. The behaviour of the larva of *Ph. mülleri* is a particularly characteristic example. The special properties of the larva of *Ph. ovalis* repeatedly referred to above of course make it a less clear example. Nevertheless, the dependence on the substratum is evident here as well.

This seems to be the place to say a few words about the asexual reproduction in the phoronids. It takes place, fundamentally, as a fission of the body of an adult. The result is what, in the literature, is called a colony. Now, this word is ambiguous as a term. In my opinion it ought to be confined to designate a group of individuals in original, organic, and permanent connection with each other. In this strictly defined sense the term is applicable to such groups of individuals as those characteristic of hydroids, octocorals, bryozoans, etc. In the groups found in certain phoronids, however, there are no connections between the bodies themselves. They are separate and the result of the vegetative propagation is, fundamentally, the same as in *Hydra, Loxosoma,* etc. (as compared with for instance, *Clava, Pedicellina,* etc.). The difference nevertheless found consists in the phoronids being tubicolar animals. Parallelly with the vegetative formation of new individuals new tubes are formed for them issuing from the original tube. The final result, an agglomeration of continuous tubes keeping the separate individuals inhabiting it together into a group, acquires the superficial appearance of a true colony. These structures in the phoronids remind of the "pseudocolonies" of, for instance, *Cephalodiscus,* fundamentally, though not in detail.

These pseudocolonies are characteristic of certain phoronid species but are absent in others.

Among the species of the Gullmar area, *Ph. ovalis* possesses particularly

well developed and intricate pseudocolonies founded on a well defined and differentiated system of budding (HARMER 1917, MARCUS 1949); the pseudocolonies of *Ph. hippocrepia* and the mode of their formation—as far as it is known—are considerably more simple and irregular (CERFONTAINE 1902, SELYS-LONGCHAMPS 1907, pp. 169 ff.); in *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* there are no indications of the existence of asexual reproduction.

As far as the phoronid species of the Gullmar area are concerned, consequently, the facts indicate the existence of a correlation between type of development and asexual reproduction: wholly pelagic development—no asexual reproduction, shorter pelagic development—simple asexual reproduction, direct development with a very short pelagic stage—regular asexual reproduction.

If such relations really exist they are of considerable interest as studies on other marine groups have indicated that the factors shortening the pelagic development are the same as those favouring the appearance of asexual reproduction (THORSON 1952). In the phoronids these propagative phenomena would seem to develop simultaneously and parallelly in one and the same species.

When we seek support for this idea in other phoronids, however, we meet with the difficulty that so little is known about their propagation.

Ph. ijimai (related to *Ph. hippocrepia*) has brood protection in the tentacle crown; the pseudocolonies characteristic of it are considered to be formed asexually (SELYS-LONGCHAMPS 1907, p. 171). *Ph. psammophila* (related to *Ph. hippocrepia*) likewise has that type of brood protection as well as pseudocolonies; it is not known in what way the latter are formed but SELYS-LONGCHAMPS's (1907, p. 182) observations on various occasions of two animals in the same tube seem suggestive. *Ph. capensis* (GILCHRIST 1908 and 1919; related to *Ph. hippocrepia*) possesses the same types of brood protection and animal groups and there are some indications of asexual reproduction in it. About the same holds true of *Ph. vancouverensis* (PIXEL 1912). *"Phoronopsis" albomaculata* has a strong reproduction by transverse fission (GILCHRIST 1919) as well as some type of brood protection, which, however, is fragmentarily known (GILCHRIST 1908, p. 157).

In the non-broodprotecting forms *Ph. architecta* and *Ph. viridis* no signs of asexual reproduction have been reported.

So far all seems to fit in fairly well. However, *Ph. australis* protects the brood in the tentacle crown but no particularly dense groups of animals nor any other signs of asexual reproduction seem to have been reported in it.

The *Ph. hippocrepia* type of developmental biology (Type II) appears as a slight variation of the *Ph. pallida* type (Type I), consisting, simply, in a small addition to the yolk contents of the egg and a retardation of the full release of the latter. The *Ph. ovalis* type (Type III) does not represent a direct

VOL. 35 1954

further advance on the way entered by *Ph. hippocrepia*. This is demonstrated by several details in its developmental biology just related. In particular, the fact is significant that the type of brood protection found in it cannot be derived from that of *Ph. hippocrepia* but must obviously be considered to have evolved independently.

SUMMARY.

Four species of the Gullmar Fiord area are treated, viz. *Ph. mülleri* Selys-Longchamps, *Ph. pallida* (Schneider), *Ph. hippocrepia* Str. Wright, and *Ph. ovalis* Str. Wright.

Experiments, rearing of larvae, etc., were performed in the laboratory and the pelagic larvae were studied. The methods employed are described.

The sexual conditions are uncovered for *Ph. pallida* and *Ph. mülleri*, tentatively indicated for *Ph. hippocrepia* and *Ph. ovalis*. The two former (possibly the two latter as well) are simultaneous hermaphrodites. No epidemic spawning or the like was observed. The fertilization is external. Autogami does not occur normally. There are no receptacula seminis; the lophophore organs (absent in *Ph. ovalis*) do not serve as such. *Ph. pallida*, *Ph. mülleri*, and *Ph. hippocrepia* are warm-water spawners, their breeding period lasting for one to several months in late summer and autumn. *Ph. ovalis* spawns in November.

The developmental cycle adult—ovum—free larva—settlement—adult is completely settled for all the four species. As many observations in this respect are summed up in the "Discussion" chapter, only some main features are mentioned here. Three types of developmental biology are represented.

I. *Ph. pallida* and *Ph. mülleri* have small eggs, the embryos are wholly pelagic and form photopositive and planktotrophic Actinotrochae, which become photonegative, settle and instantly metamorphose after about 3 weeks.

II. *Ph. hippocrepia* has larger eggs, the embryos are protected in the tentacle crown for a few days, the further development is identical with that of Type I. The pelagic life of the Actinotrocha lasts for about 2 weeks.

III. *Ph. ovalis* has still larger eggs and an almost direct development. The embryos are protected in the tube for a few days, escape as gastrulae, form lecitotrophic larvae living pelagically for 4 days without showing a definite phototaxis or adopting the Actinotrocha organisation, then settle and creep about for an exploration period of 3 days, after which they attach. The differentiation into the adult structure begins only then.

The morphology, behaviour, occurrence, etc., of the various larvae are described.

A number of correlations between various features of the developmental biology are established or indicated and their significance is discussed.

Type II represents a slight variation of Type I. Type III is far more advanced than Type II. Nevertheless, it does not represent a direct further development of that type but has evolved independently.

The conditions and occurrences connected with the settlement and metamorphosis are described and discussed.

LITERATURE.

AURIVILLIUS, C., 1898. Om hafsevertebraternas utvecklingstider och periodiciteten i larvformernas uppträdande. Bih. Kungl. Svenska Vet.-Akad. Handl., Bd. 24, Afd. IV, No. 4.

BRATTSTRÖM, H., 1943. Phoronis ovalis Wright, eine für die skandinavische Fauna neue Phoronide aus dem Öresund. Undersökn. över Öresund, 28.

BROOKS, W. K., & COWLES, R. P., 1905. Phoronis architecta. Its life history, anatomy, and breeding habits. Mem. Nat. Acad. Sci. Washington, 10.

BURDON-JONES, C., 1952. Development and biology of the larva of Saccoglossus horsti (Enteropneusta). Phil. Trans. Roy. Soc. London, S. B., 236.

CALDWELL, W. H., 1883. Preliminary note on the structure, development, and affinities of Phoronis. Proc. Roy. Soc. London, 34.

CERFONTAINE, P., 1902. Recherches expérimentales sur la régéneration et l'hétéromorphose chez Astroides calycularius et Pennaria cavolinii. Arch. de Biol., 19.

CORI, C. J., 1939. Phoronidea. BRONN's Klassen u. Ordn. d. Tierreichs, Bd. 4, Abt. 4, Buch 1, T. 1. Leipzig.

GILCHRIST, J. D. F., 1908. New forms of the Hemichordata from South Africa. Trans. Afr. Phil. Soc. Cape Town, 17.

— 1919. Reproduction by transverse fission in Phoronopsis. Quart. Journ. Micr. Sci., 63.

GUSTAFSON, G., 1936. The distribution of Phoronis mülleri De Selys Longchamps on the Swedish West Coast. Ark. f. Zool., 28 B.

HARMER, S. F., 1917. On Phoronis ovalis, Strethill Wright. Quart. Journ. Micr. Sci., 62.

IKEDA, I., 1901. Observations on the development, structure, and metamorphosis of Actinotrocha. Journ. Coll. Sci. Imp. Tokyo, 13.

— 1903. On the development of the sexual organs and of their products in Phoronis. Ann. Zool. Jap., 4.

JÄGERSTEN, G., 1940. Abhängigkeit der Metamorphose von Substrat des Biotops bei Protodrilus. Ark. f. Zool., 32 A.

KNIGHT-JONES, E. W., 1951. Gregariousness and some other aspects of the settling behaviour of Spirorbis. Journ. Mar. Biol. Assoc., 30.

LEBOUR, MARIE V., 1922. The food of plankton organisms. Journ. Mar. Biol. Assoc., 12.

MAC GINITIE, G. E., 1937. Culturing larvae of Urechis caupo. Class Gephyrea. In: GALTSOFF, P. S., etc., Culture methods for invertebrate animals. Ithaca.

MARCUS, EVELINE DU BOIS-REYMOND, 1949. Phoronis ovalis from Brazil. Bol. Fac. Fil. Ci. Letr. S. Paulo, Zool. 14.

METSCHNIKOFF, E. 1871. Über die Metamorphose einiger Seetiere. 3. Über Actinotrocha. Zeitschr. Wiss. Zool., 21.

MÜLLER, J., 1846. Bericht über einige neue Thierformen der Nordsee. Arch. Anat. Phys., 1846.

VOL. 35 1954

PIXEL, H. L. M., 1912. Two new species of the Phoronidea from Vancouver Island. Quart. Journ. Micr. Sci., 58.

RATTENBURY, JOAN C., 1953. Reproduction in Phoronopsis viridis. The annual cycle in the gonads, maturation and fertilization of the ovum. Biol. Bull., 104.

ROULE, L., 1900. Étude sur le développement embryonnaire des Phoronidiens. Ann. Sci. Nat., S. 8, 11.

SCHNEIDER, A., 1862. Über die Metamorphose der Actinotrocha branchiata. Arch. Anat. Phys., 1862.

SELYS-LONGCHAMPS, M. DE, 1902. Recherches sur le développement des Phoronis. Arch. Biol., 18.

— 1903. Über Phoronis und Actinotrocha bei Helgoland. Wissensch. Meeresunters., N.F., Bd. 6, Abt. Helgoland.

— 1904. Développement postembryonnaire et affinités des Phoronis. Mém. Sci. Acad. Belg., I.

— 1907. Phoronis. Fauna u. Flora d. Golfes v. Neapel, 30.

SILÉN, L., 1952. Researches on Phoronidea of the Gullmar Fiord area (West coast of Sweden). Ark. f. Zool., S. 2, 4.

— 1954. On the nervous system of Phoronis. Ibid., S. 2, 6.

THÉEL, H., 1907. Om utvecklingen af Sveriges zoologiska hafsstation Kristineberg och om djurlifvet i angränsande haf och fjordar. Ark. f. Zool., 4.

THORSON, G., 1946. Reproduction and larval development of Danish marine bottom invertebrates. Medd. Komm. f. Danmarks Fiskeri- og Havunders., Plankton, 4, 1.

— 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. Biol. Rev., 25.

— 1952. Zur jetzigen Lage der marinen Bodentier-Ökologie. Verh. Deutsch. Zool. Ges. in Wilhelmshaven 1951.

TORREY, H. B., 1901. On Phoronis pacifica, sp. nov. Biol. Bull., 2.

VEILLET, A., 1941. Description et mécanisme de la métamorphose de la larve Actinotroque de Phoronis Sabatieri Roule. Bull. Inst. Océan. Monaco, 810.

WILSON, D. P., 1953. The settlement of Ophelia bicornis Savigny larvae. Journ. Mar. Biol. Assoc., 31.

WILSON, E. B., 1881. The origin and the significance of the metamorphosis of the Actinotrocha. Quart. Journ. Micr. Sci., 21.

L.
5
54

VOL.
35
1954

GENETIC AND CYTOLOGICAL STUDIES OF DROSOPHILA FUNEBRIS FBR.

MUTATIONS, SALIVARY GLAND CHROMOSOMES AND VARIATION IN SEX RATIOS IN NATURAL AND LABORATORY STRAINS

BY

ANN-MARGRET PERJE

(Institute of Genetics, University of Stockholm, Stockholm, Sweden)

CONTENTS

I. Introduction 259
II. Taxonomy and geographical distribution 261
III. Material and methods 262
IV. General biology 263
V. The different strains 266
VI. Spontaneous and X-ray induced mutations 266
A. Methods 266
B. Results 268
Controls 268
X-ray experiments 269
VII. Crosses between the different strains 274
VIII. Cytology 276
A. The chromosome set 276
B. The salivary gland chromosomes 276
IX. An investigation of the sex ratios in the Frösunda strain 280
X. X-ray induced lethals in the P strain 281
XI. The variation of sex ratio in the different strains 283
XII. Acknowledgements 284
XIII. Summary 284
XIV. Literature cited 287

L.
5
54

I. INTRODUCTION

Drosophila funebris FBR. has been used in genetical, cytogenetical and cytological investigations of different kinds in many genetic laboratories. In 1916, METZ described the chromosome number as $2n = 12$, and he thought the longest pair to be the sex chromosomes. In 1919, MOHR and STURTEVANT in a laboratory culture found a semi-lethal that caused an excess of males. This phenomenon has also been described by N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1931) who by X-raying flies obtained an X-chromosome lethal that gave twice as many males as females. In breeding stocks from wild populations, I have repeatedly found flies which gave more males than females generation after generation. In order to investigate these conditions more thoroughly I have collected strains

from different laboratories and have followed the genetics of the sex ratios. But to be able to do cytogenetical studies on mutations and salivary gland chromosomes with a fly which has not been so thoroughly investigated as *D. melanogaster,* it is necessary to get suitable marker genes, to have a salivary chromosome map, and to know something about the gene content in the different strains with which the sex ratio experiments will be carried out. This paper deals mainly with a number of preliminary experiments to obtain more general information about the fly and to give a survey of the sex ratios in different strains. N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1927 a, 1927 b, 1931, 1936) and NEEL (1937) have demonstrated that the mutations have some peculiarities in their phenotypic manifestation. The penetrance and the expressivity is much lower than in *D. melanogaster,* and the species proved to be a very convenient object for the examination of some questions of theoretical genetics connected with the phenotypic manifestation of hereditary characters. A great many mutations from wild populations or from X-ray experiments have been described by SPENCER (1928, 1932), REINIG (1928), H. A. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1928, 1930 a, 1930 b, 1931), N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1927 a, 1927 b, 1931, 1932), LÜERS (1937, 1938 a, 1938 b), TINIAKOV (1936) and AUERBACH (1937). N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1936) states that the wing mutations, as incomplete wing veins, crumpled wings and bristle mutations are more common than in *D. melanogaster,* but eye colour and body colour genes rarer than in that species. Also after X-raying, the wing mutations and bristle mutations are more common than the colour mutations. N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1931) is the only investigator who has tried to make a genetical chromosome map of the mutations found. He has given the gene loci for some sex-linked genes. In the other cases—if any mutation data are given—usually the only statement is whether the genes are autosomal or sex-linked. As the descriptions of the mutations are so incomplete, it is in most cases impossible to repeat the experiments. As the gene loci of the mutations are not given, there is no possibility of stating that a newly discovered gene is an allelomorph to a gene earlier described. In a group of experiments on natural selection and intrachromosomal variability in populations of *D. funebris,* DUBININ, SOKOLOV and TINIAKOV (1937), and DUBININ and TINIAKOV (1946 a, 1946 b, 1947) have discussed the distribution of some naturally occurring inversions of *D. funebris.* In their descriptions of the inversions they have followed the numbering of the autosomes given by TINIAKOV (1936), where he has described in part the salivary gland chromosomes of *D. funebris.* He has mapped the distal and proximal ends of the chromosomes. As the middle parts of the chromosomes have not been described, the exact break points of the inversions found by DUBININ et alii (1937) are not given and it is impossible to homologize these inversions with newly found inversions from other populations. Also when

VOL. 35 1954

figures of the inversion heterozygotes are given, only a few distinct bands were drawn, so there can only be a slight possibility that the inversions are homologous.

In the Seventh International Congress of Genetics in 1939, SLIZYNSKI and SLIZYNSKA demonstrated a map of the salivary gland chromosomes of *D. funebris* and have given a description of some characteristics of the chromosomes. This map has never been published in any other form, where it would become available to other investigators, but I have received a photograph of it from Dr. SLIZYNSKA. The numbering of the autosomes on this map are not the same as in the map by TINIAKOV (1936): the autosomes 2, 3, 4, 5 of TINIAKOV correspond to 2, 5, 3, 4 respectively of SLIZYNSKI and SLIZYNSKA. As it has not been possible for me to follow in detail the map by SLIZYNSKI and SLIZYNSKA, I have found it necessary to make a completely new cytological map of *D. funebris*, with a new system of band designations. In this map the numbering of the autosomes of SLIZYNSKI and SLIZYNSKA has been used.

II. TAXONOMY AND GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION

According to PATTERSON and STONE (1952) *Drosophila funebris* has been reported from each of the six zoogeographical regions. It represents one of the eight known cosmopolitan species. It was first described by FABRICIUS in 1787. All the other members of the funebris group of the genus Drosophila in sensu stricto, that is, *D. macrospina* (STALKER and SPENCER 1939), *D. subfunebris* (STALKER and SPENCER 1939), and *D. trispina* (WHEELER 1949), are from the Nearctic region where the group has been thoroughly investigated at the University of Texas (MAINLAND 1942). The Drosophila species of other parts of the world have not been so methodically investigated as in America, so it is also possible that there are endemic species of the funebris group in other parts of the world, but that they have not yet been found. As the seven other cosmopolitan species; *D. ananassae, D. busckii, D. hydei, D. immigrans, D. melanogaster, D. repleta* and *D. simulans, D. funebris* is frequently found in domestic habitats, where it is especially common around stables. According to MAINLAND (1942) *D. funebris* is widespread in North America, but it seems to be a species recently introduced by man. Although all the species of the funebris group resemble each other morphologically, *D. funebris* is cross-sterile with all the other members. From these facts, especially distributional and ecological, MAINLAND found it probable that *D. funebris* has been recently introduced to North America. In Germany, N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY and others have done populations experiments with the species, showing that it is a common fly in that part of Europe. In Russia, DUBININ, SOKOLOV and others have investigated inversions in natural populations from the neighbourhood of Moskow and from some places in Asia, where it also appears in great

abundance. Reports from Great Britain, France and Italy indicate that it is a common species in this part of Europe. In Sweden, I have found the species in many different populations throughout South and Middle Sweden.

III. MATERIAL AND METHODS

In the laboratory, *D. funebris* breeds readily on the same cornmeal-syrup-agar culture medium as *D. melanogaster*. To maintain the strains, the flies were reared in milk bottles. In experimental cultures,—pair cultures or mass cultures—the flies were reared in small vials in order to facilitate handling and to save space. A block of cornmeal-syrup-agar were laid upon a piece of cardboard and placed in the vial. Every third day, the cardboard with the food-block was taken out and replaced by new food. This method provides the flies with a good food supply which is necessary for maximum reproductive activity in the adult stage. It also assures that the larvae cultures will not be over-crowded and it will give a good estimate of the age of the flies. The eggs and young larvae on the agar blocks were transferred to another vial with a concentrated yeast suspension sucked up by cellulose wadding, as it is a well established fact that the larvae are best fed up on a diet of yeast (DEMEREC 1950). As this medium does not afford an adequate medium for adults, the flies must be counted and transferred soon after emergence. This method has been introduced to the Institute of Genetics in Stockholm by LÜNING (1952) for breeding *D. melanogaster,* and it is found to be a relatively satisfactory culture method for *D. funebris*. The highest recorded yield from a pair mating in the experiments were 869. In all the experiments the cultures were kept in an incubator at a temperature around 25° C. Only for cultures reared to obtain larvae for cytological purposes were the vials kept at about 18°—20° C, at which temperature the development is rather slow, but which does not disturb the pairing tendency of the chromosomes in the salivary glands.

The X-ray irradiations were made at the Radiophysical Institute with a Siemens Stabilivolt apparatus (155 kV, 6 mA, with 1 mm Al filtration).

The cytological preparations were obtained by making acetocarmine smears of the larval ganglion for studying metaphase plates of the larval neuroblasts and of the salivary glands for the giant salivary gland chromosomes. In order to spread the chromosomes, the coverslips were treated with silicone Dri-film nr 9987 and the slides were albuminized. To get permanent preparations, the slides were passed into 70 per cent. alcohol to loosen the coverslips, then into 95 per cent. alcohol and absolute alcohol, after which the preparations were mounted in Euparal. The preparations were examined in a Leitz Ortholux microscope with phase contrast equipment (objectives PvApo 40/0.70 and PvApoÖl 90/1.10, eyepiece Periplan 6 ×). As enhanced contrast is possible by

VOL. 35 1954

TABLE 1. The time of development from egg-laying to adult fly in two different experiments in the H strain. Every experiment is the result of 9 pair matings. The sex ratio for a given day is calculated as the sum of all males emerged up to that day, divided by all flies emerged up to the same day.

	Days after egg-laying													
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
H 1 ♂♂	53	114	207	90	122	35	24	9	17	5	9	2	—	—
♀♀	85	100	182	96	149	28	16	13	25	8	7	3	—	—
totals	138	214	389	186	271	63	40	22	42	13	16	5	—	—
sex ratio	0.38	0.47	0.50	0.50	0.49	0.49	0.50	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	—	—
H 2 ♂♂	14	104	290	182	131	26	54	43	32	18	25	15	7	5
♀♀	34	98	275	143	194	29	44	65	29	31	35	26	7	3
totals	48	202	565	325	325	55	98	108	61	49	60	41	14	8
sex ratio	0.29	0.47	0.50	0.52	0.49	0.49	0.50	0.49	0.49	0.49	0.48	0.48	0.48	0.48

combining phase contrast with staining, the chromosomes were faintly stained in acetocarmine (only 1—2 minutes). In dark contrast, the nucleoprotein containing bands will appear dark against the light internodes, so the chromosomes will show the same patterns as in a common light microscope.

IV. GENERAL BIOLOGY

For the sex ratio experiments, which are indicated in the introduction, it is necessary to know if the rate of development of the larvae and pupae are the same in the females as in the males. In order to study this the following preliminary experiment was made: in eighteen pair matings from the H strain which, in the first experiments, was taken as a standard stock, newly laid eggs were taken out from the vials every day and transferred to new vials with yeast-cellulose food, as described in the section "material and methods". The cultures were bred in an incubator of 25° ± 1° C. The number of days between egg-laying and emergence of the adult fly was determined. The experiments were carried out in two series, H 1 and H 2, with 9 pair cultures in each. As no real difference could be found between the 9 pair matings within a series, only the total results are of interest here. In table 1 and fig. 1 the results of these experiments are given. In fig. 1 the days after egg-laying are plotted against males emerging per day, calculated as percentages of the total number of males emerging (the unbroken line). The broken line represents the percentages of emerging females to total females. The maxima of emergence for both sexes are on the thirteenth day after the eggs were laid.

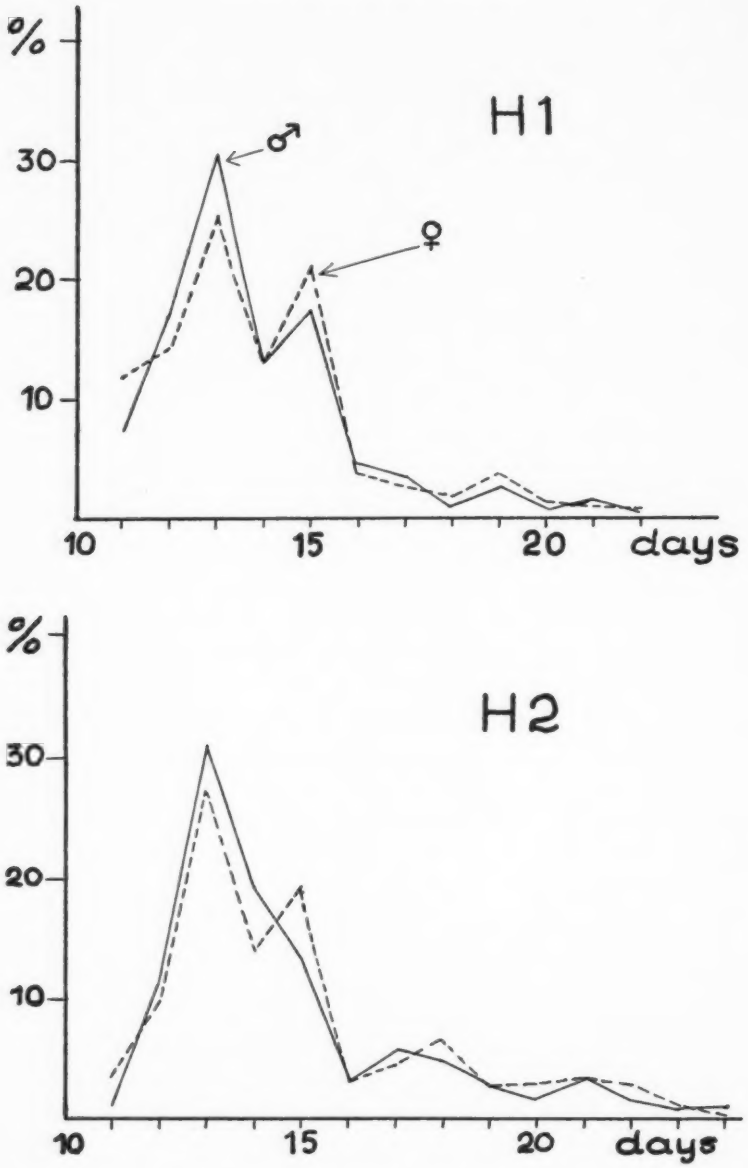


Fig. 1. Experiment in the H strain of *D. funebris* showing the time of development from the day of egg-laying to the emergence of the adult. The unbroken line represent the percentages of males emerging on one day to the total males emerged. The broken line gives the same results for the females.

VOL. 35 1954

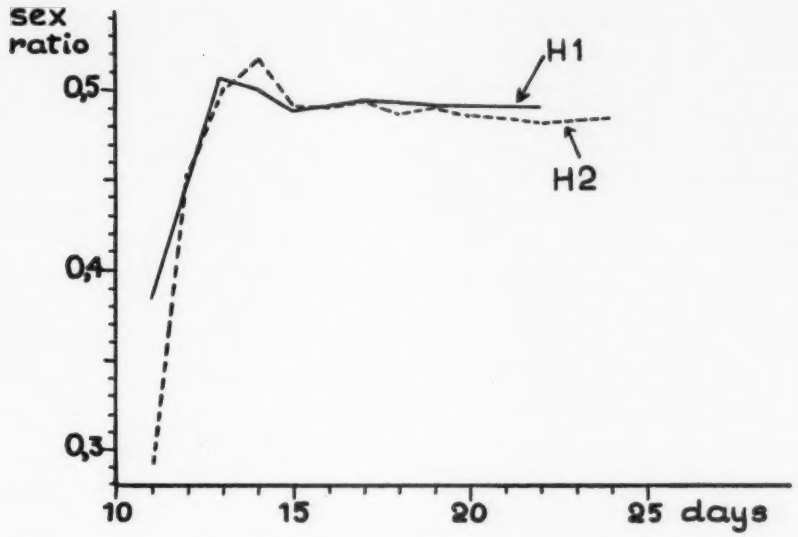


Fig. 2. The sex ratios from the experiments in table I are plotted against the days of development from egg to adult fly.

L.
5
54

At the 15th day there is a new maximum in the curves in both H 1 and H 2, so it probably represents some reality. It can be that the breeding does not take place under optimal conditions. Initially it could be due to competition for food and only the strongest larvae will be able to develop in a normal time, and the others have no place to develop until the first ones have become pupae. No other analysis has been made to clear up this problem. As in *D. melanogaster,* the development of males is somewhat slower than that of females, but after the first day of hatching there are more males than females for several days and then the sex ratio will become nearly constant. In fig. 2, the sex ratio for the different days has been calculated in the following way: all the males which have emerged before a definite day are divided by the total number of flies which have emerged to this day. In the diagram the sex ratios are plotted for each day of hatching. The sex ratios will stabilize on the 15th day in both experiments. If the cultures in the sex ratio experiments are counted more than 15 days after egg-laying there will be no noticeable error in the sex ratio from differences in development of the two sexes. In practice it is convenient to count the flies from one vial three times, namely on the 12th, the 15th and the 18th day after egg-laying. All the countings for sex ratios in the present experiments were made in this way.

In an incubator of 25° C the preoviposition period is about 2—4 days. The whole life cycle of *D. funebris* can be completed in 13 days. The average time in these laboratory experiments has been 16—18 days. One female can

lay eggs more than 40 days after emergence, but in the experiments here, the eggs are taken only on the 7th, the 10th, the 13th, the 16th and the 19th day after the first pairing has taken place.

V. THE DIFFERENT STRAINS

The strains employed for this study are of two different types: strains which has been maintained in various laboratories for many years, and material collected more recently and analyzed soon after collection from nature. The first flies studied were captured on horse manure in Frösunda, a place near to Stockholm, Sweden in 1947. About 20 flies were bred in a mass culture, and in each generation the males were more frequent than the females. This strain had low vitality and became extinct after about 15 generations. In the rest of the experiments a strain from Lidingö (L) was used as the Swedish standard stock. These flies were captured by Miss Ruth Sävhagen in Lidingö. As in the Frösunda strain the first generation was made of a mass culture of about 20 flies. Another Swedish strain (K) was taken at Koön near Marstrand in 1953 and the first generation in the laboratory was a mass culture of about 100 flies. The reason for beginning with mass cultures was to avoid low vitality by too intensive inbreeding and to find more hidden recessive genes from the strains. It also gives a higher possibility of maintaining rearrangements within the strains. From other parts of the world I have obtained the following laboratory strains, listed in Drosophila Information Service (DIS). The other strains employed are (see fig. 3):

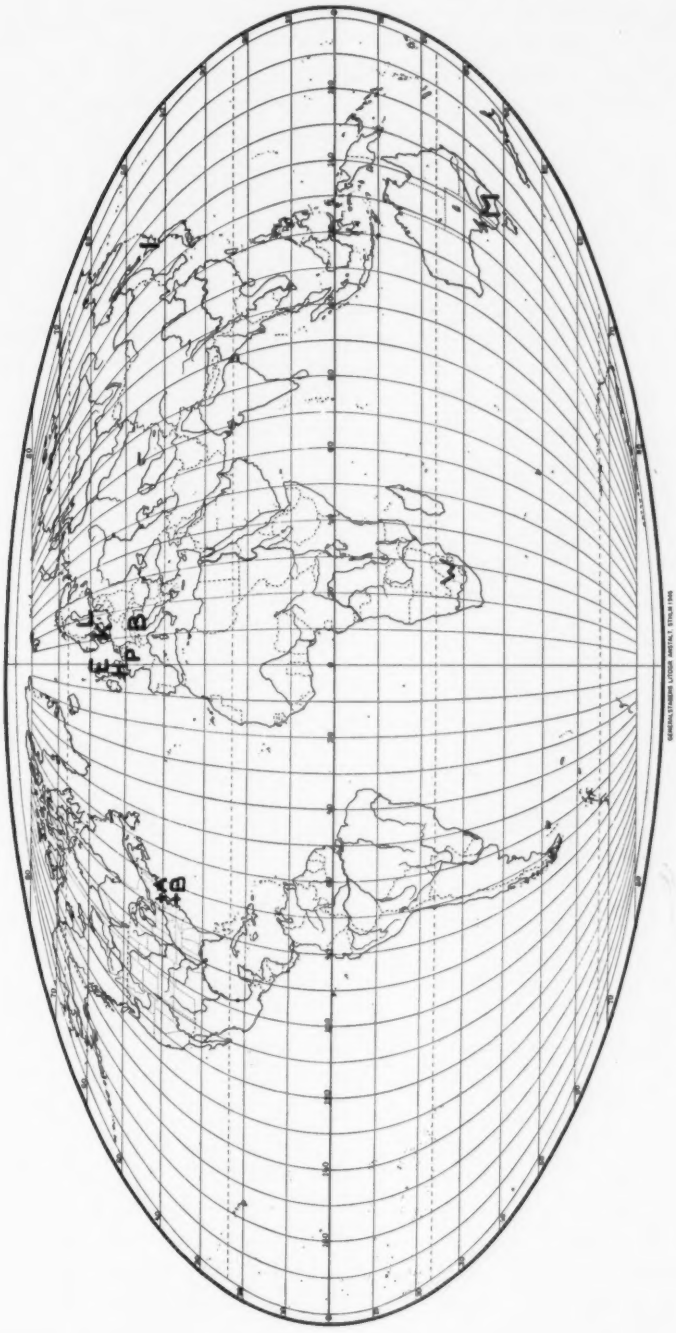
+ A and + B from Philadelphia, USA
B from Belluno, Italy
E from Edinburgh, Scotland
H from Hendon, England
I from Imagane, Japan
M from Melbourne, Australia
P from Paris, France
W from Witwatersrand, Johannesburg, South Africa

VI. SPONTANEOUS AND X-RAY INDUCED MUTATIONS

A. METHODS

In order to obtain good mutations as markers on different parts of the chromosomes, females were irradiated (2 320 r) and crossed to nonirradiated males of the same strain in mass cultures. In the F_1 generation, males and

VOL. 35 1954


Ka
Ka
Ka

females were classified and all variants from the wild type noted. All types of variants were crossed and controlled in two generations. If only normal flies were found in the progeny of these two generations the variants were marked as phenocopies in table II. The possibility exists that they can be due to mutations concealed by modifiers, or by a low penetrance under the particular environment. I have not continued the crossings to more than F_2 as in any case such mutations would be no good markers.

As Drosophila populations usually provide a relatively good source of genetic variability, certain kinds of mutations could be secured more easily from the laboratory strains than by radiation. This is the case with autosomal recessives, which could not be found from the radiation experiment described above. As a control experiment and to extract the mutations already spread in the strains, flies were counted from mass cultures of the same strains as were irradiated. The control and radiation experiments were made at the same time, in order to give the actual state of the laboratory strain at the time of radiation. In all the series, 10 000 males were counted and as many females as were found at the same time.

N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1929, 1936) has shown that many mutations in *D. funebris* change in phenotypic expression under differing environments and genetic modifiers. As there can be a great difference in the modifiers of different strains, I have repeated the experiment with 6 strains, namely P, L, + B, E, B, and H. Of these only the L strain was taken directly from nature. The other strains have been maintained as small laboratory populations for many generations.

VOL. 35 1954

B. RESULTS

In table II the results of both controls and X-ray experiments (RP, RL, R + B, RE, RB, and RH) are given.

Controls: The genetic variants, found in the control series of the laboratory strains are mainly so-called quantitative characters showing variable expression. They are mainly recessives, one showing incomplete and variable dominance and the others mostly a very low penetrance. Most common are the wing shape mutations which are found in all the six strains. The first five variant types listed in table II — upturned wings, crumpled wings, downturned wings, bubble wings and miniature wings — could sometimes be different manifestations of the same character, but in the radiation experiments, I have obtained different mutations for all the five types. The phenotypes of these mutations partly overlap; often some percentage of crumpled wings could be found among all these wing mutations. Repeated crossings between flies with crumpled wings from the controls gave no pure stock of the character, as sometimes the females were sterile, and sometimes the progeny of F_1 and F_2 were mainly of wild type, showing only a very low percentage of crumpled

wings. Many of the flies listed in table II could be phenocopies, as the wing development is dependent on the moisture and other factors in the environment. As all the controls are made under the same conditions the differences between the strains must be mainly of genetic origin. It is obvious that gene differences leading to all-or-none reactions, as some eye colours and body colours, are rapidly sorted out from the populations, but such mutations which are concealed by modifiers and which show low expressivity in quantitative characters, have a greater possibility of remaining in the populations.

Only two mutant stocks have been extracted from the control series:

1) *scute* from the L strain. It is a sex-linked recessive with less than four scutellar bristles. The penetrance is more than 95 %, but the expressivity variable. Most of the flies lack the two anterior scutellar bristles, but other flies can have from 0—3 bristles. About 6 % of the females heterozygous for *scute* show the effect, so it is a gene with incomplete dominance.

2) *radius incompletus* from the H strain. The phenotypic manifestation looks like the mutant described by N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1927 a). It is an autosomal recessive with low penetrance and very variable expression. Sometimes the crossveins are lacking instead of parts of the longitudinal veins. Often there are no real gaps in the veins, but they are thinner at the corresponding places.

The character *abnormal abdomen* behaves as the mutant described by N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1932). Genetic as well as environmental factors can evoke the phenotype. Often the flies which emerge the last day in a vial will show this character. The cause of this might be that flies with the genetic character *abnormal abdomen* have a longer development than normal flies or that the unfavorable environment for the last larvae evokes the phenotype.

Sometimes in the strains there will be flies with seven or eight legs. Only once has a female with seven legs produced a son with an extra leg. In all other cases the progeny have been normal. The character has only been found 14 times in 248 000 flies. If it is a genetic character within all the races, the penetrance must be very low.

Of course this method gives a poor idea of the total number of visibles in the controls, and the genetic variability disclosed will represent only a fraction of that present.

X-ray experiments: The X-ray experiments, where females were irradiated, were made to obtain good sex-linked markers in as easy a manner as possible. It is well known that in *D. melanogaster* the mutation frequency after irradiation of females is much lower than after irradiation of males, but as no non-disjunction mechanism was available for the detection of sex-linked mutations in the F_1 after male radiation, I had no choice other than to irradiate females. N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1936) has made a comparison between the mutability of *D. funebris* and *D. melanogaster,* where he has also discussed the results

Visible variant types found in controls (P, L, +B, E, B, and H) and after X-raying of

Stocks	P	RP	L	RL	+B	R+B	E
Total number of flies / Variant	21999	21930	22031	21662	20859	19973	2056
1. Upturned wing	15	16	20	10	6	3	13
2. Crumpled wing	8	10	28	13	71	246	47
3. Downturned wing	1	1	4	—	1	77	8
4. Bubble wing	1	1	—	5	—	9	—
5. Miniature wing	3	3	—	10	—	4	—
6. Divergent wing	—	—	—	—	—	—	—
7. Wing margin	—	2	—	3	—	5	1
8. Wingless	—	1	—	—	—	—	—
9. Extra vein	—	3	—	—	—	2	—
10. Disrupted longitudinal vein	—	3	—	2	—	2	1
11. Broad vein	—	1	—	—	—	—	—
12. Crossveinless	—	1	—	—	—	—	—
13. Abnormal abdomen	3	—	2	4	3	49	24
14. Extra legs	—	2	—	1	—	2	4
15. Dacks legs	—	—	—	1	—	2	4
16. Small leg	—	—	—	—	—	1	—
17. Aristapedia	—	—	—	—	—	1	—
18. Antennaless	—	—	—	—	—	4	—
19. Fused palps	—	—	—	—	—	2	1
20. Dark palps	—	—	—	—	—	1	—
21. Split scutellum	—	—	—	—	—	1	—
22. Dwarf	—	—	—	4	—	—	—
23. Tumor	1	—	—	—	—	—	—
24. Yellow body colour	—	1	—	—	—	—	—
25. Rough eye	—	1	—	1	—	—	—
26. Orange eye colour	—	1	—	—	—	—	—
27. Light red eye colour	—	—	—	—	—	—	—
28. White eye colour	—	—	—	1	—	—	—
29. Dark eye colour	—	—	—	1	2	—	—
30. Mosaic eye colour	—	—	—	—	—	1	—
31. Small eye	—	—	—	—	1	—	—
32. Eyeless	—	—	—	1	—	—	—
33. No dorsocentrales	—	—	—	—	—	4	3
34. No postverticales	—	—	—	—	—	2	—
35. 0—3 scutellar bristles	—	—	1	—	—	1	—
36. Reduced scutellar bristles	—	—	—	1	—	1	—
37. Hairless and bristleless head	—	—	—	1	—	—	—
38. Forked bristles	—	1	—	2	—	1	—
39. Small bristles	—	—	—	—	—	—	—
40. Thin bristles	—	1	—	—	—	—	—
41. Gynandromorphs	—	1	—	5	—	1	—
Total changes	32	50	55	66	84	422	106
Per Cent	0.15	0.23	0.25	0.30	0.40	2.11	0.52

VOL. 35 1954

males with 2320 r (RP, RL, R + B, RE, RB, and RH) in six different strains of *D. funebris*.

RE	B	RB	H	RH	Totals		Mutant character in F_1 or F_2	Normal progeny in F_1 and F_2 (phenocopies)	Remarks	Variant number
1376	18607	19939	20092	19675	Controls 124092	Irradiated 124555				
17	—	8	10	10	64	64	+	+		1.
119	214	43	51	41	419	472	+	+		2.
1	1	1	1	—	16	80	+	+		3.
1	1	5	1	3	3	24	—	+		4.
2	—	—	—	2	3	21	+	+		5.
2	—	—	—	—	—	2	—	—	sterile	6.
13	—	2	—	1	1	26	+	+		7.
1	—	—	—	—	—	2	—	—	sterile	8.
4	—	—	—	—	—	9	+	—		9.
3	—	9	106	34	107	53	+	—		10.
—	—	—	—	—	—	1	+	—		11.
—	—	3	—	—	—	4	+	—		12.
31	14	61	9	58	55	203	+	+		13.
1	—	3	—	1	4	10	—	+		14.
69	—	2	3	3	7	77	+	+		15.
—	—	—	—	1	—	2	—	+		16.
—	—	—	—	—	—	1	+	—		17.
1	—	—	—	1	—	6	+	+		18.
1	2	—	—	—	3	3	+	—		19.
—	—	4	—	—	—	5	+	+		20.
—	—	—	—	—	—	1	—	+		21.
2	—	1	—	—	—	7	—	—	sterile	22.
—	—	—	—	—	1	—	—	—	sterile	23.
4	—	—	—	—	—	5	+	+	in RE phenocopies	24.
2	—	1	—	—	—	5	+	—		25.
—	—	—	—	—	—	1	—	—	sterile	26.
1	—	1	—	—	—	2	+	—		27.
—	—	—	—	—	—	1	+	—		28.
—	—	—	—	—	2	1	+	+		29.
—	—	—	—	—	—	1	—	—	sterile	30.
—	—	—	—	—	1	—	—	+		31.
—	—	—	—	—	—	1	—	+		32.
5	—	10	—	—	3	19	+	+		33.
—	—	2	—	—	—	4	+	+		34.
—	—	4	—	—	1	5	+	—		35.
3	—	—	—	—	—	5	—	+		36.
2	—	1	—	2	—	6	—	—	sterile	37.
1	—	—	—	—	—	5	—	—	3 mosaics 2 sterile	38.
1	—	—	—	1	—	2	—	+		39.
1	—	1	—	—	—	3	+	—		40.
3	—	—	—	—	—	10				41.
291	232	162	181	158	690	1140				
1.36	1.25	0.81	0.90	0.80	0.56	0.92				

TABLE III. Results of genetic tests of some variants from the X-ray experiment mentioned in table II. The upper part of the table shows the recessive, sex-linked visibles, the lower part the dominants.

Variant number in table II	Number of mutants	Mutation	Phenotype earlier described by	Mode of inheritance
1.	1	eversae (ev)	Timoféeff-Ressovsky DIS 2	sex-linked recessive
5.	1	miniature (m)	Timoféeff-Ressovsky DIS 2	sex-linked recessive sterile in homozygous females
12.	1	crossveinless (cv)	Timoféeff-Ressovsky DIS 2	sex-linked recessive
24.	1	yellow (y)	—	sex-linked recessive
25.	1	rough (ro)	—	sex-linked recessive
27.	2	vermilion (v)	Lüers DIS 5	sex-linked recessive
28.	1	white (w)	Timoféeff-Ressovsky Lüers DIS 5	sex-linked recessive
Totals	8	in 60000 males in F_1 after treatment of P_1 females with 2320 r		
11.	1	Broad vein (Bv)	—	autosomal dominant
7.	3	Beaded (Bd)	Spencer DIS 1	autosomal dominant
7.	3	Notch (N)	Timoféeff-Ressovsky DIS 2	sex-linked dominant
6.	1	Divergens (D)	Timoféeff-Ressovsky DIS 2	autosomal dominant
9.	5	Plexus (Px)	Timoféeff-Ressovsky DIS 2	autosomal dominant
10.	1	Venae incompletae (Vi)	Lüers DIS 5	autosomal dominant
37.	1	Hairless (H)	Spencer DIS 1	autosomal dominant
40.	1	Leptochaetae (Lch)	Lüers DIS 5	autosomal dominant
Totals	16	in 124555 flies in F_1 after treatment of P_1 females with 2320 r		

by earlier investigators on the mutability in *D. funebris* (ROMASCHOFF and BALKASCHINA 1931; SPENCER 1928, 1935; H. A. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY 1930 and N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY 1931). He has given the following qualitative differences between the two species: 1) in *D. funebris* mutations showing 100 % penetrance are relatively rare, 2) in *D. funebris* dominant mutations occur with a greater frequency than in *D. melanogaster* and 3) in *D. funebris* there is a different pattern of mutations than that found in *D. melanogaster,* that is, wing shape, bristle, venation, and wing margin mutations which show variable expression, are common, but the all-or-none mutations as eye colour and body colour are seldom to be found. My own data agree with these results. Among all the variants found after radiation only the

VOL. 35 1954

mutations given in table III were possible to use as marker genes. All the others had a very low penetrance.

All the sex-linked recessives in table III had 100 % penetrance and were as good markers as the corresponding sex-linked genes in *D. melanogaster*. It is obvious that dominant genes are frequent in *D. funebris* (table III). The manifestations of the characters are nearly 100 % in the genes in the table, and they can be used as good markers of X-chromosomes and autosomes.

The *vermilion* mutations were obtained from two different strains, and are allelic. Whether they are homologous to *vermilion* in *D. melanogaster* has not been shown, but STUBBE and VOGT (1940) have indicated the homology between a gene *vermilion* in *D. funebris* and that in *D. melanogaster*, through transplantation experiments. As the locus of the *vermilion* gene in *D. funebris* is not given, the homology of that *vermilion* with the one I have obtained in these X-ray experiments is not certain but is probable. A *cinnabar* — gene is described by KIIL in DIS 20, and he has located it in autosome 2. As the light-red eyes mutation I have obtained is sex-linked I have named it *vermilion* and not *cinnabar*.

On five different occasions in the X-ray experiment, *forked* or *singed* mutations appeared. Two males died soon after emergence and three were mosaics all of which showed wild type progeny.

Only once has a *white* mutation occurred, and this mutation provides a very good marker in the X-chromosome. The character can be distinguished also in the larvae where the Malpighian tubes are white instead of yellow.

Of the *Notch* mutations found, none showed *white* at the same time. *Notch* is sex-linked and in crossings it gave 1—2 % crossing over with *white*.

The *yellow* mutation from RP has yellow body colour but black bristles. From this mutation I have got a *yellow* stock with 100 % penetrance. The four flies from RE (one male and 3 females, in table II) all had a pale body colour and black bristles. The male died after a few days, and the females gave progeny of wild-type in F_1 and F_2. These three flies either must have been phenocopies or have come from a gene in the E strain with low phenotypic manifestation.

Since a *yellow* mutation with pale bristles is preferable as a marker, I irridiated normal males from the L strain (3 000 r) and crossed them to *yellow* females in mass cultures. Table IV gives the results of this experiment. The very

TABLE IV. Mutations after the cross of irradiated wild type males of the P strain to non-treated *yellow* females.

Number of flies ♂♂	♀♀	yellow ♀♀	yellow Bar ♂	+- ♂♂	yellow white ♂♂	gynandromorphs
24599	21564	27	1	14	4	4

high number of F_1 *yellow* females can be due to non-disjunction, which can not be distinguished from mutations by this method. In *D. virilis* KIKKAWA (1932, 1935) is of the opinion that the mutation *yellow* increases the rate of non-disjunction and it could perhaps be the same thing here. The 14 +-males were all sterile and they are probably XO-males, which earlier have been shown to be sterile in *D. funebris* by LÜERS (1938 b). All the *yellow* females were crossed to obtain progeny, but 12 died before the preoviposition period had ended, 5 others were sterile, 3 lethals and 7 had normal vitality and showed the normal *yellow* character after crossing. Only one of all the 27 *yellow* females had yellow bristles, but she gave no progeny. It is obvious that the character *yellow* in *D. funebris* usually only affects the body and wing colour, a difference from *D. melanogaster* where most of the *yellow* alleles show yellow bristles too. This condition is similar to the case in *D. virilis* where *yellow* mutations with dark bristles have been described several times (METZ, MOSES and MASON, 1923 and GIRVIN, 1949).

The four *y w* males are quite inexplicable. They can not be contaminations, as there was no *y w* stock in the laboratory at the time for the experiment, and they must have been formed on four different occasions, as they appear after four different treatments. Thus they can not have been the result of a cluster stemming from a gonial mutation. As they gave no progeny they could not be further analyzed. In *D. funebris* the loci for *yellow* and *white* lie in different parts of the X-chromosome and they show 50 % crossing over. No *white* mutation has ever been found in the *yellow* stock.

VOL. 35 1954

VII. CROSSES BETWEEN THE DIFFERENT STRAINS

As the mutations obtained in the X-ray experiments have come from different strains it is necessary in planning the cross experiments to know if there is any sexual isolation between the strains. From the beginning of these investigations, the H strain was taken as a standard and at that time a preliminary experiment was carried out to determine the possibilities of crossing the H strain with the other strains at the laboratory. The results of these crosses are given, together with the later experiments, in table V. In these the L strain was taken as a standard and all the other strains were crossed to it. In table V are given all the different types of crosses carried out. The fertility percentage of the controls given in the table is based on a check of more than 100 tested pairs. The crosses between the strains were made in mass cultures, but the crosses with the F_1-hybrid, obtained from these mass cultures, were carried out in twenty pair matings. All these crosses gave good progeny (in the table marked as +), as did the backcrosses between the hybrids and the parental stocks in most cases. The only case where no viable offspring were

TABLE V. Crosses between different strains of *D. funebris*. F_1 hybrids are crossed to each other and backcrossed to both the parental strains. The numbers given for the pure strains indicate the fertility percentages.

♀ \ ♂	L	P	H	E	B	I	M	W	+A	+B	LP	LH	LE	LB	LI	LM	LW	L+A	L+B
											PL	HL	EL	BL	IL or LI	ML	WL	+AL	+BL
L	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P	+	98	+								+								
H	+	+	93	+	+				+	+		+							
E	+		+	94									+						
B	+		+		91									+					
I	+					85									+				
M	+						78									+			
W	+							77									+		
+A	+		+						69									−	
+B	+		+							90									+
PL or LP	+	+									+								
LH LH	+		+									+							
EL LE	+			+									+						
BL LB	+				+									+					
IL LI	+					+									+				
ML LM	+						+									+			
WL LW	+							+									+		
+AL L+A	+								−									+	
+BL L+B	+									+									+

obtained in spite of repeated crosses was the backcrosses between the Lidingö (L) / Philadelphia (+ A) hybrid and the Philadelphia (+ A) parent in both the reciprocal combinations.

In the table V, each type of hybrid is indicated as follows: the symbols show the female first. Thus LP is the hybrid from the cross Lidingö ♀ × Paris ♂, and PL indicates the reciprocal cross. In all the matings these types of hybrids, formed by reciprocal crosses, have given the same results.

Some of the backcrosses yielded only a few flies. As only 20 pair matings have been used in the cross experiments, the numbers of cultures were too few to give the fertility percentage or the average number of offspring in the cultures.

The results of these cross experiments indicate that some of the strains which show no marked morphological differences, have attained some degree of reproductive isolation, but these strains have not yet reached the taxonomic

level of subspecies. It is remarkable that geographic strains from so different places as those shown in figure 3, show such slight divergence in isolating mechanisms. It is obvious that in these strains gene exchanges can take place rather readily and that the strains of *D. funebris* are at the very beginning of evolutionary divergence.

VIII. CYTOLOGY

A. THE CHROMOSOME SET

The chromosome number of *D. funebris* is given by METZ (1916) to $2n = 12$, with 5 pairs of rods and one pair of dots. Two of the chromosomes are longer than the others. They are heterochromatic (HEITZ, 1933), and represent the two sex chromosomes. The Y-chromosome is wholly heterochromatic, but the X-chromosome has a euchromatic part of about the same length as the autosomes in the ganglion cell preparations. The Y chromosome is a little shorter than the X-chromosome. HEITZ has shown that in the metaphase complements of *D. funebris* and *D. virilis*, both of which have the primitive chromosome number of $2n = 12$, the heterochromatic material is distributed in different ways. In *D. funebris* nearly all the heterochromatin is concentrated in the X- and Y-chromosomes and in the sixth chromosome, but in *D. virilis* it is equally distributed in the proximal parts of all the chromosomes. Surely, the addition, loss and redistribution of heterochromatin must have occurred several times in the evolution of Drosophila, but the most primitive condition is not known.

In all of the eleven strains of *D. funebris*, the metaphase patterns are alike, and the distribution of the heterochromatin is the same. No differences of the kind found between *D. virilis* and *D. funebris* have been found between the strains. The only anomaly found in all the strains was a small heterochromatic extra chromosome in a B male (fig. 4). Five males and five females were investigated in every strain.

Concentration of the heterochromatin in a single pair of chromosomes is known in other species of Drosophila, as in the sex chromosomes of *D. pallidipennis* described by DOBZHANSKY (1944). The figures of the heterochromatic sections of the salivary gland chromosomes of that species are much like those from *D. funebris*.

B. THE SALIVARY GLAND CHROMOSOMES

The salivary chromosome map of *D. funebris* (see Plate I) is made from the Lidingö-strain. The system of band designation employed by PATTERSON, STONE and GRIFFEN (1940) for the *D. virilis* map has been used here. The

VOL. 35 1954

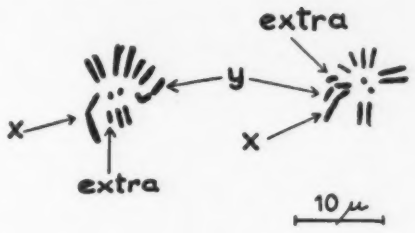


Fig. 4. Metaphase chromosomes from the larval ganglion of a B male of *D. funebris* showing an extra chromosome.

capitals from A—H refer to the large sections, where H is the heterochromatic part of the chromosome. Chromosome 6, which often is wholly heterochromatic, has only an H section. The second division of the large sections is numbered from 1—5. As in the salivary chromosome map constructed by BRIDGES of *D. melanogaster*, the division point is always made just to the left of the chosen main band. In nearly all places the subdivisions will begin with a sharp band. The separate bands are not given definite numbers, because those numbers would change from year to year as our knowledge of the banding becomes more detailed. Only in the text, the separate bands in the divisions are marked with small letters, as in some cases it is necessary to refer to single bands.

The X-chromosome is easy to identify. The free end flares out loosely and the heterochromatic part of the chromocenter is the proximal part of the chromosome. In male it is more faintly stained than the autosomes. Even in the female it is more heterochromatic and the bands are often less distinct than in the autosomes. Some parts are in several cells heterochromatic portions (B1—2, B4—5, and F4, the last one a very easily identified puff). D3 is a weak point, where the chromosome often breaks in the preparations. Often the heterochromatin of the F4 puff lies in non-homologous association with the chromocenter heterochromatin, giving a picture resembling an inversion loop.

Chromosome 2 is the longest of the autosomes. Its free end has a short straight section, followed by a puff, which is the most characteristic part of the whole chromosome. In the bands between sections B and C, the chromosome has a weak point. In 2E2 lies a big, often heterochromatic puff, directly followed by four heavily stained bands. The attached end 2G4—5 is a mass which is frequently almost broken loose from the rest of the chromosome. The attached end is quite free of heterochromatic material.

Chromosome 3. Except for the microchromosome 6, this is the shortest of the salivary elements. The free end is sometimes difficult to distinguish from chromosome 4, but in most cases it is possible to find the three darkly stained bands in 3A1. In some of the cells the first bands of chromosome 3 and chromosome 4 are heterochromatic. In that case it is difficult to distinguish between

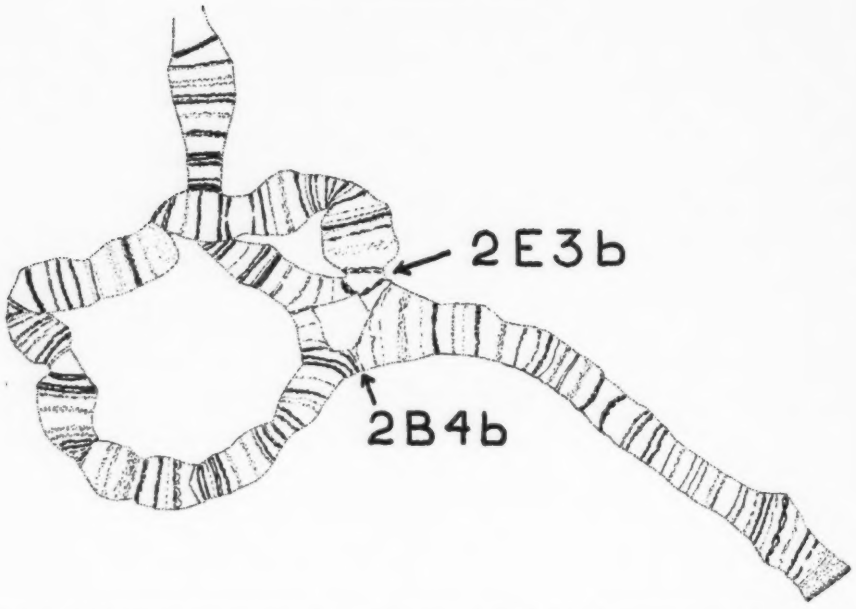


Fig. 5. An inversion heterozygote for chromosome 2 from the L population of *D. funebris*.

VOL. 35 1954

the end bands. No other chromosome has so many weak points and constrictions as the third (in 3A/B, often in 3C2—3, 3D/E, 3F2, 3F/G, and 3G4), in which the most easily recognized part is the attached end with the three well delimited regions 3F2—3G1, 3G1—4, 3G4—the attached point, 3B1, 3C1, 3E3—4, 3F4—5 and 3G1—2 are readily distinguishable puffs. The attached section of the chromosome, 3G5—H1, is often completely heterochromatic.

Chromosome 4. The weak points in this chromosome are in 4B/C, 4E2, and sometimes in 4F2. One of the most striking repeats of the funebris chromosomes lies in 4B3—5. It is a reversed duplication, which in some cells shows inversion loops. Also in case that no knot is formed, this region is easily found as it has faintly stained bands and often is heterochromatic. TINIAKOV (1936) has described the free ends and the attached parts of the chromosomes. In his incomplete map he has drawn the repeat of chromosome 4 (in TINIAKOV chromosome 3) as a small inversion.

Chromosome 5. This chromosome shows sometimes a knot in 5A4—5. The weak points in 5B1, 5C3, and 5E1, and the puffs in 5C2—3, and 5D3—4 are good landmarks. The white sections between the dark bands in the free end (5A4) and the attached end (5G4) are the most characteristic parts of the chromosome.

Chromosome 6. It is characterised by large, fuzzily stained bands. Often the whole chromosome is heterochromatic, and in some cells it is entirely incorpo-

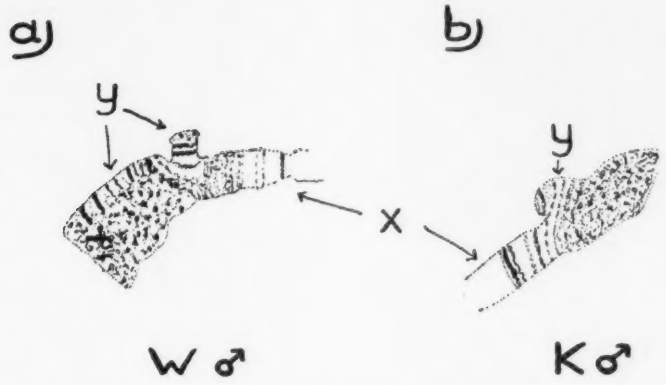


Fig. 6. Salivary gland chromosomes of males of the W and the K strains, showing the Y-chromosomes.

rated in the central heterochromatic mass, so that it looks like a part of the X-chromosome.

In the Lidingö strain, some of the flies were heterozygotes for an inversion in the second chromosome (fig. 5). Homozygotes of both kinds of chromosome arrangements occurred. This inversion is very much alike the one described by DUBININ, SOKOLOV and TINIAKOV (1937) as inversion C II M, which was widely distributed in the Russian populations. The same inversion as in the L-strain is also found in the Paris strain. Thus it must be an old inversion, widely distributed among the races.

The Y-chromosome: The heterochromatic parts of the Y-chromosome show intimate pairing with the heterochromatin of the X-chromosome in the salivary glands. The Y-chromosome also consists of a euchromatic part, which in some cells pair with the X-chromosome (fig. 6 b). It has the same structure as the other euchromatic elements but shows a very poor stainability. In other cases, a few euchromatic disks can be seen in the heterochromatic mass (fig. 6 a). BAUER (1936) was unable to identify the Y-chromosome in either *D. funebris* or *D. hydei*. In *D. funebris* it is obvious that in most cases the large heterochromatic mass, formed by the proximal parts of the X- and Y-chromosomes, conceals the euchromatic sections of about 15—20 pale disks of the Y-chromosome. It is only in favourable preparations that the Y-chromosome can be seen.

An investigation of the differences in the salivary gland chromosomes of the different strains has not yet been concluded.

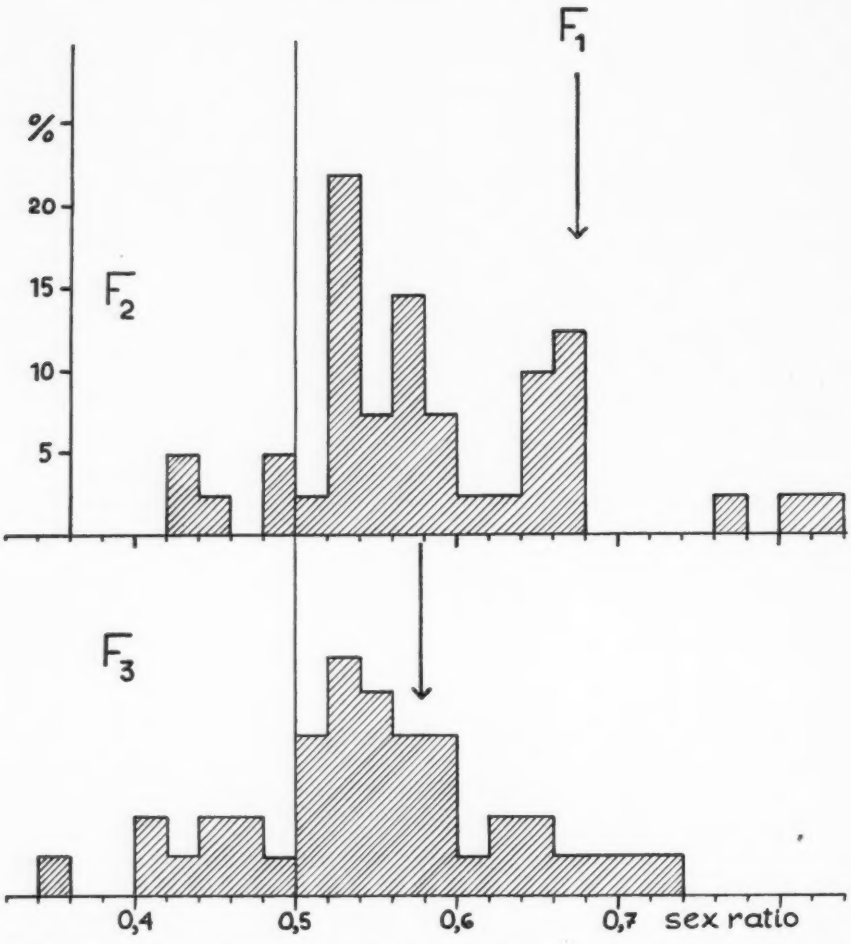


Fig. 7. Distribution frequencies of the sex ratios in two generations of the Frösunda strain of *D. funebris*, starting with a sex ratio in the F_1 generation of 0.675, and in F_2 of 0.578.

IX. AN INVESTIGATION OF THE SEX RATIOS IN THE FRÖSUNDA STRAIN

In 1947, some flies of *D. funebris* were caught in Frösunda, near Stockholm. In a crossing between one female and two males from this population the F_1 progeny gave a sex ratio of 0.675 (53♀♀ and 110 ♂♂). From the F_1's, pair matings were made and the sex ratios determined. In fig. 7 the results from the different crossings are given in histograms. In the F_2 generation,

VOL. 35 1954

some cultures still have a sex ratio of 0.66—0.68, but most of the sex ratios are distributed between 0.52 and 0.60. The vertical line is drawn to indicate the normal sex ratio of 0.50. As seen from the diagram, nearly all the cultures lie to the right of that line, and only a few pair matings gave more females than males. F_3 pair matings are made from a F_2 culture with a sex ratio of 0.578. The F_3 frequency distribution is broader and flatter than in F_2 and more cultures with more females than males are found.

A female carrying a recessive lethal in that part of the X-chromosome which is non-allelic to the Y-chromosome, will produce twice as many daughters as sons (sex ratio $= \frac{1}{3}$), but a female, carrying a recessive lethal in that part of the X which is allelic to the Y, as *bobbed* in *D. melanogaster,* will give twice as many males as females (sex ratio $= \frac{2}{3}$) in the progeny, if mated with a male carrying the same lethal in his X-chromosome.

As can be seen in fig. 7 one maximum lies at 0.66—0.68 in F_2, which indicates that we really are dealing with a sex-linked lethal having a normal allele in the Y-chromosome. As the P crossing was not initially planned as a sex ratio experiment, it was made with one female and two males and not with a pair mating which should have been adequate for such an experiment. The following generations gave only 41 cultures with more than 30 flies (all other cultures have been omitted in the diagram as the flies are too few in such a culture to give a reliable sex ratio), and no real conclusions can be drawn from the other maximum at about 0.52—0.54, which should instead have been situated at about 0.50, if the lethal had been sorted out.

X. X-RAY INDUCED LETHALS IN THE P STRAIN

If it is sex-linked recessive lethals that change the sex ratio in some of the strains of *D. funebris,* it should be possible to induce such mutations by X-raying. For that reason, irradiated males (about 4 800 r) from the P strain were crossed in mass matings to untreated females from the same strain, which at that time in pair matings showed only few deviations from the normal sex ratio. The F_1-females were analyzed according to the cross diagram in fig. 8. Two kinds of lethals can appear: 1) the usual type of recessive lethals as in fig. 8 a and 2) lethals which have a +-allele in the Y-chromosome as in fig. 8 b.

The progeny from every F_1-female was counted, and if no lethals of the first type were found, six F_2-pairs were made to search for lethals of the second type. The following results were received from this experiment:

Tested chromosomes	Sex-linked lethals without allele in the Y. "$\frac{1}{3}$-lethals"	Sex-linked lethals with alleles in the Y. "$\frac{2}{3}$-lethals"
461	35	16

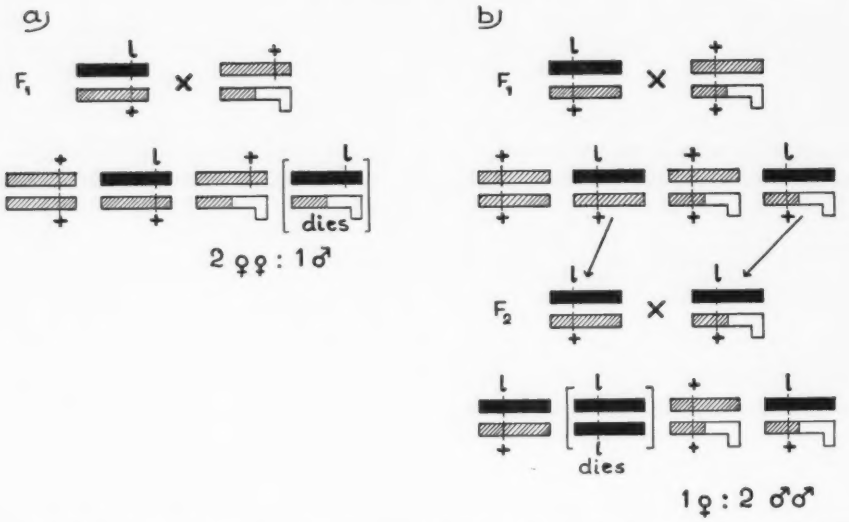


Fig. 8. Experimental procedure for detection of lethals in the X-chromosome; to the left the ordinary lethals, without alleles in the Y ($\frac{1}{3}$-lethals), and to the right, lethals in the X with +-alleles in the Y ($\frac{2}{3}$-lethals). Males were irradiated and their daughters crossed individually, according to the schedule above. The treated X-chromosome is black. The parts of the Y without genes are white, and the euchromatic parts of non-treated chromosomes lined.

VOL. 35 1954

This result indicates that lethals in the part of the X which have no allele in the Y (sex ratio $= \frac{1}{3}$) are more frequent than lethals with alleles in the Y-chromosome (sex ratio $= \frac{2}{3}$).

Later experiments have shown that it is probable that modifier-genes can suppress the $\frac{2}{3}$-lethals. In planning this experiment it was not determined if the P strain had such modifier-genes, so it is possible that some of the lethals obtained were not X-ray induced but were present in the P strain, where they could have been concealed for some generations by suppressors. If that is the case, 16 is too high a number for the $\frac{2}{3}$-lethals. Also, under such conditions, this experiment has shown that it is not uncommon to find $\frac{2}{3}$-lethals in *D. funebris*, and that the X- and Y-chromosomes of that species have homologous sections.

It has not yet been determined if all of these $\frac{2}{3}$-lethals are alleles or if whole sections of the Y-chromosome are homologous with the X-chromosome, and it has not been shown if it is the part of the Y which is euchromatic in the salivary gland chromosomes that carries the alleles, or if the loci are situated in the heterochromatic part of the chromosome.

TABLE VI. Distribution of sex-linked lethals in the different strains.

Strain	Number of cultures with sex ratio 0.33	0.50	0.67	Totals	♀♀	♂♂	Totals	Sex ratio average
+A	2	80	8	90	6474	6920	13394	0.52
+B	8	80	2	90	6437	6068	12505	0.49
B	1	83	13	97	10679	11961	22640	0.53
E	1	90	4	95	10366	10763	21129	0.51
H	1	87	10	98	7837	8172	16009	0.51
I	3	89	2	94	12526	12554	25080	0.50
K	5	98	2	105	10813	11015	21828	0.50
L	2	33	8	43	2650	2830	5480	0.52
M	2	69	35	106	12708	15389	28097	0.55
P	5	40	6	51	2293	2418	4711	0.51
W	5	98	1	104	12254	12212	24466	0.50
Totals	35	847	91	973	95037	100302	195339	

XI. THE VARIATION OF SEX RATIO IN THE DIFFERENT STRAINS

In order to find out if sex-linked lethals have accumulated in the strains about 100 pair matings were made from all the strains and the sex ratios determined. The true values of these sex ratios were estimated assuming them to be $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{2}$ or $\frac{2}{3}$. If a and b are the numbers and p and q the expected frequencies of females and males respectively, it is possible to determine those p and q values which give the maximum value to the expression $p^a q^b$. The three sex ratios $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ and $\frac{2}{3}$ correspond to $(\frac{1}{2})^a \cdot (\frac{1}{2})^b$, $(\frac{2}{3})^a \cdot (\frac{1}{3})^b$ resp. $(\frac{1}{3})^a \cdot (\frac{2}{3})^b$. The results are given in table VI. As can be seen from this table, the $\frac{2}{3}$-lethals are more frequent than the $\frac{1}{3}$-lethals, although among the X-ray induced lethals the $\frac{1}{3}$-lethals are the most common. This must depend on the high negative selection against $\frac{1}{3}$-lethals in the populations. On the contrary, the $\frac{2}{3}$-lethals have greater possibilities of increasing in the populations as they can be carried as heterozygotes through both sexes. If such a lethal has arisen once in a population, it has great possibilites of being preserved.

An interesting feature in the sex ratio distribution in the populations is that the maximum is not situated at 0.50 as would be expected, but more often at 0.52—0.54. This is the same condition that occurred in the Frösunda strain (see fig. 7), which had more males than females in most of the cultures in the F_2 and F_3 generations. In fig. 9 the distribution frequencies of the sex ratios in the different strains are given. The numbers within the histograms indicate the frequencies of the cultures which lie resp. to the left and to the right of the marked 0.50-line. Only four strains (+B, I, K and W) show

about the same value on both sides of the line, five strains (+A, H, E, L and P) have about 65 % to the right of the line and in B, 74 % of the cultures had more males than females and in M the corresponding value in 86 %. This unequal distribution, which seems to be the common condition in most of the strains, could be explained if it is assumed that a combination of at least two genes is required to obtain the lethal effect. If one of these genes lies in the Y-homologous section of the X and the other in an autosome, other maxima should be expected in the sex ratio at about 0.53 and 0.57. If the gene is situated in the non-homologous section of the X instead of an autosome, other values between 0.50 and 0.67 should be expected depending on the distance between the two genes in the X. Possibly modifiers or suppressors which are so common for the different visible mutations in *D. funebris* can act also on the lethals. Selection experiments are going on to analyse these conditions in more detail.

XII. ACKNOWLEDGEMENTS

I want to express my sincere gratitude to my teacher Professor G. Bonnier for valuable advice and criticism during the work. I am also indebted to the Swedish Natural Science Research Council and Bokförlaget Natur och Kultur for generous financial aid during the course of the investigation and to Mrs. Anita Alm, Mrs. Barbro Arnberg and Miss Ruth Sävhagen for capable and painstaking technical assistance. To all those who in various ways have assisted me to get the laboratory strains I wish to convey my cordial thanks.

VOL.
35
1954

XIII. SUMMARY

1. Methods for breeding *D. funebris* are given.

2. The differences in the time of development between males and females are discussed in connection with determination of sex ratios.

3. The eleven strains from different parts of the world, employed in this investigation, are introduced.

4. Spontaneous mutations were extracted from the strains. They showed low penetrance and variable expression.

5. Sex-linked mutations were induced in order to obtain good markers for cross experiments. Some of the mutations are discussed in detail. Dominant mutations were found to be common.

6. As the *yellow* mutation, obtained by radiation, had black bristles, a special X-ray experiment, where males were irradiated and crossed to *y* females,

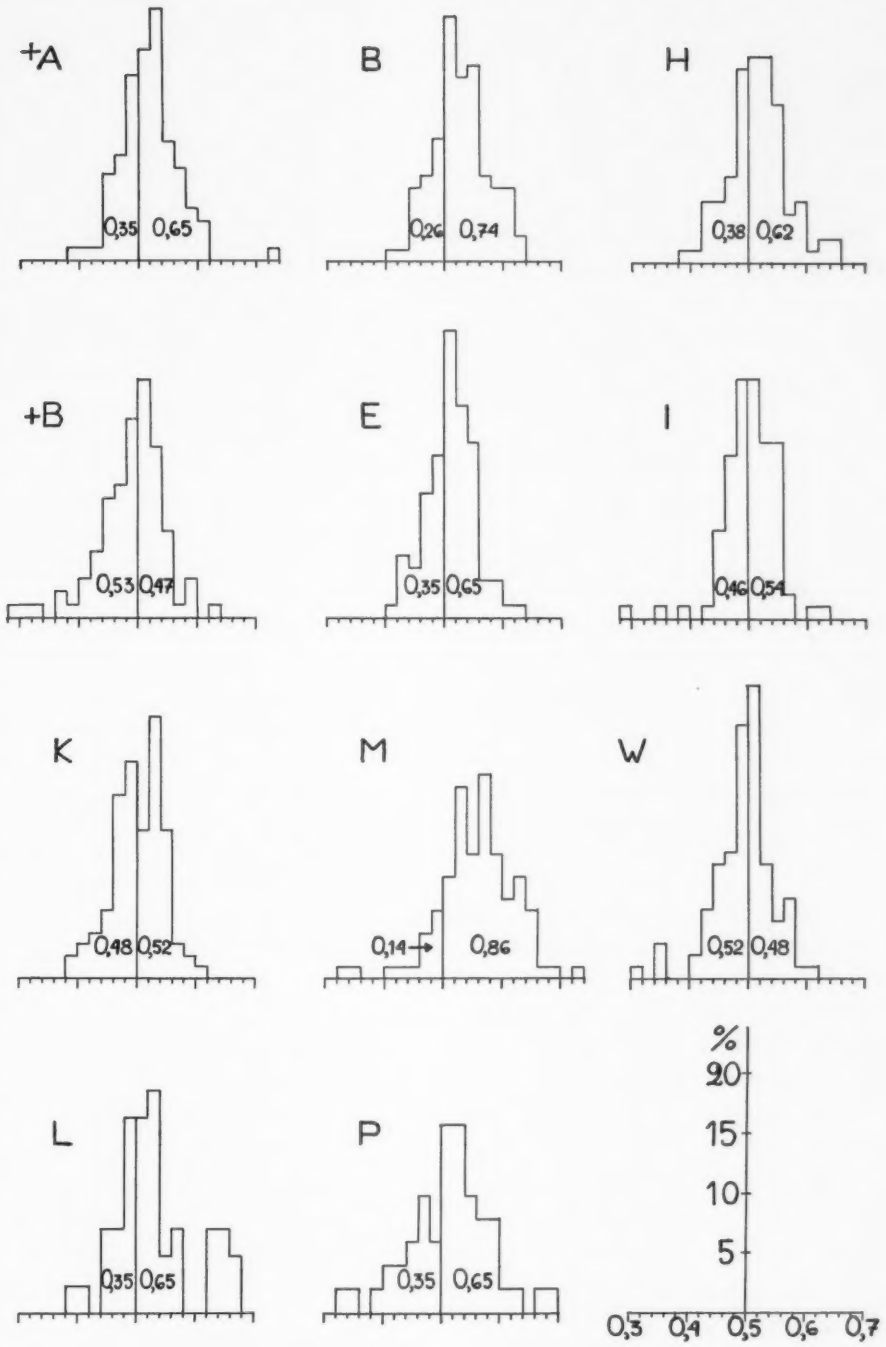


Fig. 9. Histograms showing the distribution frequencies of the sex ratios of eleven different strains of *D. funebris*. (See text.) The numbers indicate the frequencies to the left and to the right of the 0.50-line.

was carried out in order to detect *yellow* mutations with yellow bristles. Among 27 *y* females, only one showed that character, but this fly was sterile.

7. Crosses between the different strains and the L strain, which was taken as a standard, and backcrosses between the F_1-hybrids and the parental strains, gave good progeny in most cases. Only the backcross between the L/+A hybrid to the +A parent in both the reciprocal combinations was completely sterile. Thus the strains have attained some slight degree of reproductive isolation, but they have not yet reached the taxonomic level of subspecies. Gene exchanges can easily take place between the different strains.

8. No differences were found in the metaphase patterns of the strains. One male in the B strain had a small heterochromatic extra chromosome, but this was an individual anomaly and not a strain difference.

9. The salivary gland chromosomes of the L strain are mapped and the landmarks of the chromosomes described.

10. The Y-chromosome has about 20 euchromatic disks in the salivary glands.

11. In the L population, a long inversion is found in chromosome 2. This inversion is viable also in homozygous condition.

12. In the Frösunda strain, some crosses produced twice as many males as females. This was probably due to sex-linked lethals situated in that part of the X which was homologous with a part of the Y.

13. In an X-ray experiment was shown that induced sex-linked lethals in the part of the X which had no homologous alleles in the Y ($=\frac{1}{3}$-lethals) were more common than the lethals in the part of the X which had a homologous section in the Y-chromosome ($=\frac{2}{3}$-lethals).

14. The sex ratios were determined in about 100 pair matings in every strain. $\frac{2}{3}$-lethals were more frequent than the $\frac{1}{3}$-lethals which must depend on the high negative selection against $\frac{1}{3}$-lethals in the populations.

The maximum of the frequency distribution of the sex ratios is not situated at 0.50, but in most cases at about 0.52. A sex ratio of more than 0.50 can be explained in a genetical way, if suppressor genes or modifiers have an influence on the $\frac{2}{3}$-lethal, or if it is necessary to have at least two different genes in order to obtain a lethal effect. One of these genes must lie in the Y-homologous part of the X. The other can lie in the differential segment of the X or in an autosome. Selection experiments are going on in order to investigate these points.

VOL.
35
1954

STUDIES OF DROSOPHILA FUNEBRIS

XIV. LITERATURE CITED

1. AUERBACH, CH. 1937. Studies on egg shape and fecundity in *Drosophila funebris*. *Drosophila Information Service*, 7 : 87.
2. BAUER, H. 1936. Structure and arrangement of salivary gland chromosomes in *Drosophila* species. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 22(4) : 216—222.
3. BRIDGES, C. B. 1935. Salivary chromosome maps. *Jour. Hered.*, 26 : 60—64.
4. DEMEREC, M., (Ed.) 1950. Biology of Drosophila. John Wiley & Sons, Inc, New York.
5. DOBZHANSKY, T. 1944. Distribution of heterochromatin in the chromosomes of *Drosophila pallidipennis*. *Amer. Nat.*, 78 : 193—213.
6. DUBININ, N. P., M. N. SOKOLOV, and G. G. TINIAKOV. 1937. Intraspecific chromosome variability. *Biologichesky Zhurnal* (Moscow), 6 : 1007—1054.
7. —, and G. G. TINIAKOV. 1946 a. Natural Selection and chromosomal variability in populations of *Drosophila funebris*. *Jour. Hered.*, 37 : 39—44.
8. —, and G. G. TINIAKOV. 1946 b. Inversion gradients and natural selection in ecological races of *Drosophila funebris*. *Genetics*, 31 : 537—545.
9. —, and G. G. TINIAKOV. 1947. Inversion gradients and selection in ecological races of *Drosophila funebris*. *Amer. Nat.*, 81 : 148—153.
10. GIRVIN, E. C. 1949. X-ray produced mutations, deletions and mosaics in *Drosophila virilis*. *Univ. Texas Pub.*, 4920 : 42—56.
11. HEITZ, E. 1933. Über totale und partielle somatische Heteropyknose, sowie strukturelle Geschlechtschromosomen bei *Drosophila funebris*. *Z. Zellforsch.*, 19 : 720—742.
12. KIKKAWA, H. 1932. Contribution to the knowledge of non-disjunction of the sex chromosomes in *Drosophila virilis*. I. General problems. *Cytologia*, 3 : 340—349.
13. —, 1935. Contributions to the knowledge of non-disjunction of the sex chromosomes in *Drosophila virilis*. II. The mode of reduction of the heterochromosomes. *Cytologia*, 6 : 177—189.
14. LÜERS, H. 1937. Shaker, eine erbliche Bewegungsstörung bei *Drosophila funebris*. *Z. i. A. V.*, 72 : 119—126.
15. —. 1938 a. Ein beitrag zur vergleichenden Genetik an Hand des dominanten *Bobbed* im Y-Chromosom von *Drosophila funebris*. *Z. i. A. V.*, 74 : 70—90.
16. —. 1938 b. Analyse eines Falles geschlechtsbegrenzter Vererbung bei *Drosophila funebris* unter besonderer Berücksichtigung des Y-Chromosoms. *Biol. Zbl.*, 58 : 385—393.
17. LÜNING, K. G. 1952. X-ray induced dominant lethals in different stages of spermatogenesis in Drosophila. *Hereditas*, 38 : 91—107.
18. MAINLAND, G. B. 1942. Genetic relationships in the *Drosophila funebris* group. *Univ. Texas Pub.*, 4228 : 74—112.
19. METZ, C. W. 1916. Chromosome studies on the Diptera. III. Additional types of chromosome groups in the Drosophilidæ. *Amer. Nat.*, 50 : 587—599.
20. —, M. S. MOSES, and E. D. MASON. 1923. Genetic studies on *Drosophila virilis* with considerations on the genetics of other species of Drosophila. *Carn. Inst. Pub.* (Washington), 328.
21. MOHR, O. L., and A. H. STURTEVANT, 1919. A semi-lethal in *Drosophila funebris* that causes an excess of males. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 16 : 95—96.
22. NEEL, J. 1937. Phenotypic variability in mutant characters of *Drosophila funebris*. *Jour. Exp. Zool.*, 75 : 131—142.
23. PATTERSON, J. T., and W. S. STONE. 1952. Evolution in the Genus Drosophila. The McMillan Company, New York.
24. —, W. S. STONE, and A. B. GRIFFEN. 1940. Evolution of the virilis group in Drosophila. *Univ. Texas Pub.*, 4032 : 218—250.

25. Reinig, W. F. 1928. Über das Manifestieren zweier Genovariationen bei *Drosophila funebris. Biol. Zbl.*, 48: 115—125.
26. Romaschoff, D. D., and E. I. Balkaschina. 1931. Beiträge zur Genetik der *Drosophila funebris. Z. i. A. V.*, 58: 1—80.
27. Spencer, W. 1928. New mutants in *Drosophila funebris. Jour. Exp. Zool.*, 51: 177—197.
28. —. 1932. The phænogenetics of *Drosophila funebris. Ohio Jour. Sci.*, 32: 525.
29. —. 1935. The non-random nature of visible mutations in Drosophila. *Amer. Nat.*, 69: 223—238.
30. Stalker, H. D., and W. P. Spencer. 1939. Four new species of Drosophila, with notes on the funebris group. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 32: 105—112.
31. Stubbe, A. E., and M. Vogt. 1940. Über die Homologie einiger Augenfarbgene bei *Drosophila funebris* und *Drosophila melanogaster* an Hand von Augentransplantationen. *Z. i. A. V.*, 78: 251—254.
32. Timoféeff-Ressovsky, H. A. 1928. Gynandromorphen und Genitalien-Abnormitäten bei *Drosophila funebris. Roux' Arch.*, 113: 254—266.
33. —. 1930 a. Induced gene-variations in *Drosophila funebris. Jour. Hered.*, 21: 167—171.
34. —. 1930 b. Röntgenbestrahlungsversuche mit *Drosophila funebris. Naturwiss.*, 18: 431—434.
35. —. 1931. Über phänotypische Manifestierung der polytypen (pleiotropen) Genovariation Polyphæn von *Drosophila funebris. Naturwiss.*, 19: 765—768.
36. Timoféeff-Ressovsky, N. W. 1927 a. Studies on the phenotypic manifestation of hereditary factors. I. On the phenotype manifestation of the genovariation *radius incompletus* in *Drosophila funebris. Genetics*, 12: 128—198.
37. —. 1927 b. A reversed genovariation in *Drosophila funebris. Genetics*, 12: 125—127.
38. —. 1929. Der Einfluss der Temperatur auf die Ausbildung der Queradern an den Flügeln bei einer Genovariation von *Drosophila funebris. Jour. Psych. Neur.*, 38: 134—146.
39. —. 1931. Zur Genetik der *Drosophila funebris*. I. Geschlechtsgebundene Vererbung. *Roux'Arch.*, 124: 154—180.
40. —. 1932. Die heterogene Variationsgruppe "Abnormes Abdomen" bei *Drosophila funebris. Z. i. A. V.*, 62: 34—46.
41. —. 1936. Qualitativer Vergleich der Mutabilität von *Drosophila funebris* und *Drosophila melanogaster. Z. i. A. V.*, 71: 276—280.
42. Tiniakov, G. G. 1936. The inert regions and general morphology of the chromosomes in the salivary gland cells of Drosophila. *Biologichesky Zhurnal*, 5: 753—802.
43. —. 1939. The Bar and aristapedia in *Drosophila funebris. Drosophila Information Service*, 11: 52.
44. Wheeler, M. R. 1949. Taxonomic studies on the Drosophilidæ. *Univ. Texas Pub.*, 4920: 157—195.

VOL. 35 1954

OL.
35
954

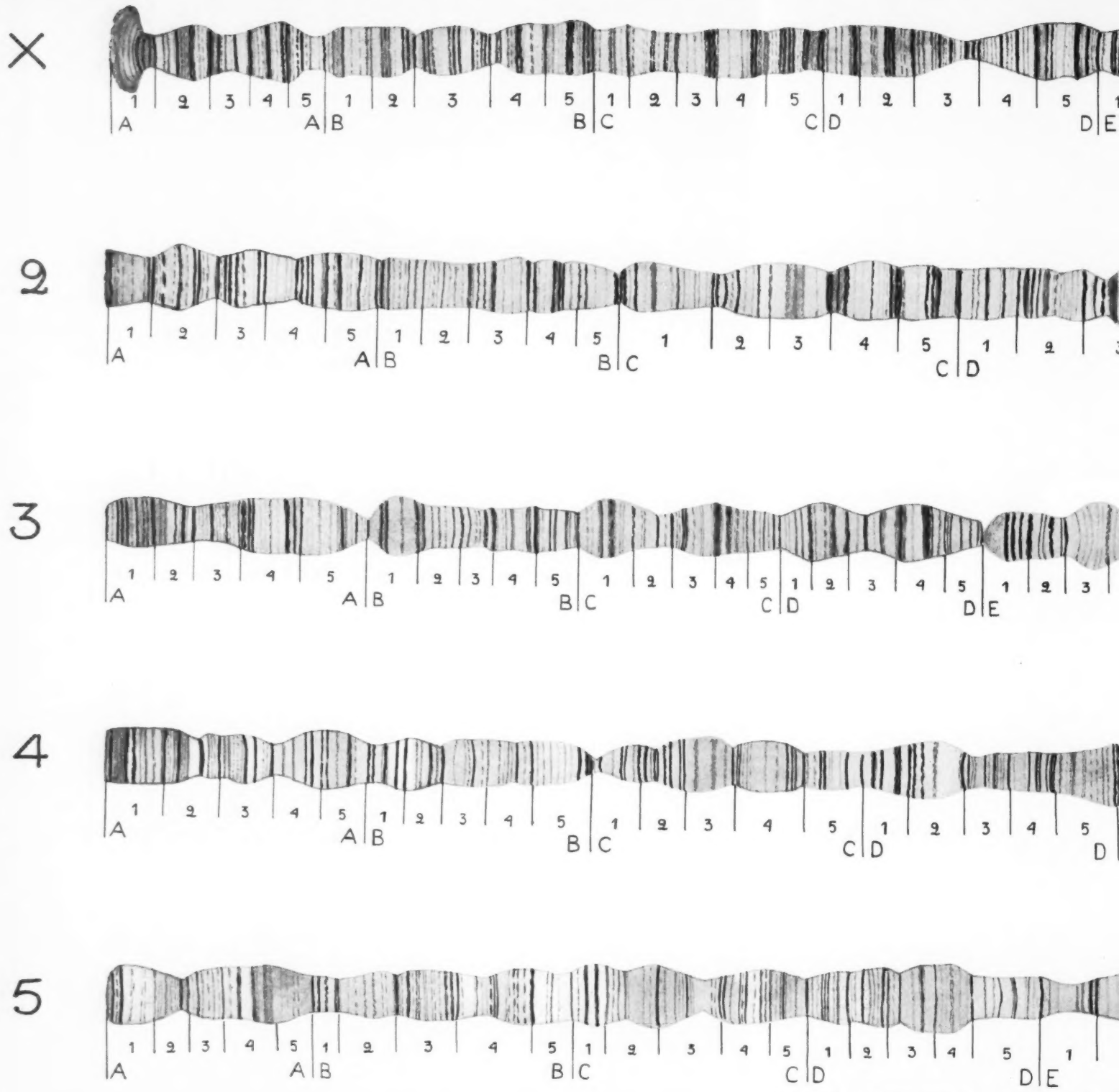
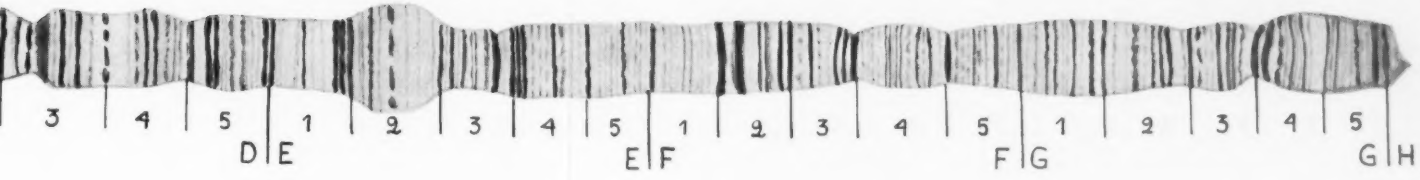
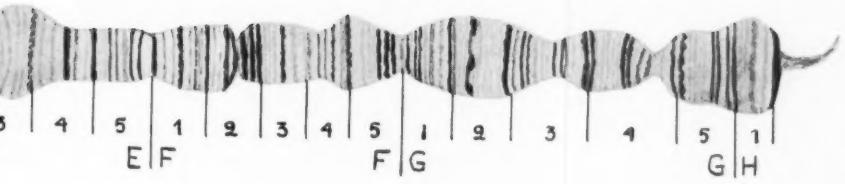
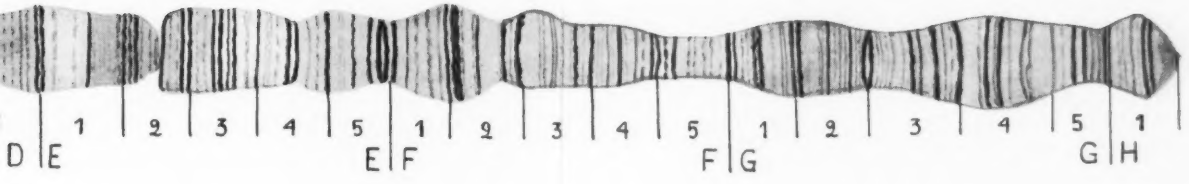


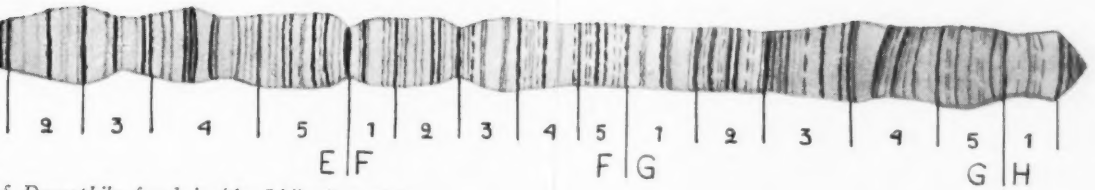
PLATE I. Salivary gland chromosome map of *D*





6





of *Drosophila funebris* (the Lidingö strain).

VOL.
35
1954

THE EFFECTS OF ADRENALINE, NORADRENALINE, TYRAMINE AND OTHER DRUGS ON THE ISOLATED HEART FROM MARINE VERTEBRATES AND A CEPHALOPOD (ELEDONE CIRROSA)[1]

BY

RAGNAR FÄNGE AND ERIC ÖSTLUND[2]

CONTENTS

Material and methods 290
Results 293
A. Teleosts 293
B. Selachians 294
C. Cyclostomes 297
D. Cephalopodes 299
Summary 302
References 303

L.
5
54

Adrenaline has a very wide distribution in the animal series (see reviews by WENSE 1938 and HANSTRÖM 1939). Besides adrenaline there has been isolated from animal organs a number of other structurally related amines such as noradrenaline (EULER 1951, 1952, ÖSTLUND 1954), tyramine (HENZE 1913) and dopamine (GOODALL 1951, EULER, HAMBERG & HELLNER 1951, GREGERMAN 1952, SHEPHERD & WEST 1953). Adrenaline has a stimulatory effect both on the vertebrate heart and on the invertebrate heart in the majority of the cases. The actions of the other adrenaline-like amines on the heart of invertebrates and lower vertebrates have not been very much investigated. The aim of the present work was to compare at first hand the effects of adrenaline, noradrenaline, dopamine (= hydrozytyramine) and tyramine on the isolated hearts of a number of marine animals. In addition to the mentioned substances the effects from some other physiologically active substances were also studied.

Reviews dealing with the comparative physiology of the heart have been published by CLARK (1927), DUBUISSON (1933), FREDERICQ (1947) and PROS-

[1] Aided by a grant from Kungl. Fysiografiska Sällskapet, Lund, and Lars Hiertas Memorial Foundation, Stockholm.

[2] From the Department of Zoophysiology, University, Lund, the Department of Physiology, Karolinska Institute, Stockholm and the Marine Zoological Station Kristineberg, Fiskebäckskil, Sweden.

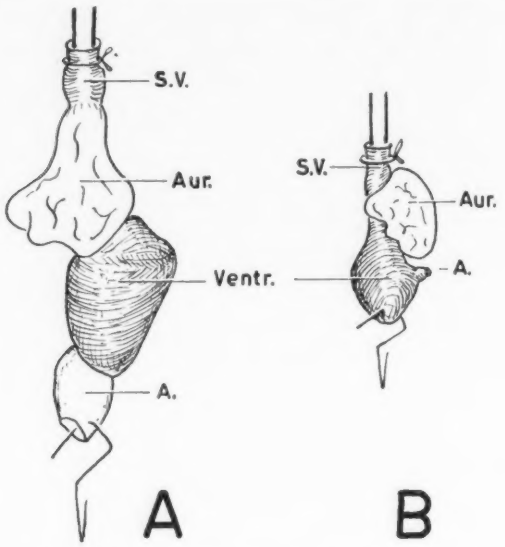


Fig. 1. Diagram showing the isolated heart of:
A. *Gadus callarias.* **B.** *Myxine glutinosa.* A. aortic bulb; Aur. auricle; S. V. venous sinus; Ventr. ventricle.

VOL. 35 1954

SER et al. (1950). More detailed information on the effects of different drugs upon the heart of lower vertebrates and cephalopodes are found in the following original papers: *teleosts:* BERESIN (1913), JULLIEN & RIPPLINGER (1950); *selachians:* MACDONALD (1925), LYON (1926), IZQUIERDO (1930), LUTZ (1930), HUNTSMAN (1931), ROTH (1935), HIATT (1943), RABBENO (1951); *cyclostomes:* ITINA (1941); *cephalopodes:* BACQ (1933, 1934), KRUTA (1935, 1936), BEAUVALLET (1937), UNGAR (1937), FREDERICQ & BACQ (1939), ERSPAMER & GHIRETTI (1951).

MATERIAL AND METHODS

The animal material consisted of the following species:
A. *Teleosts: Gadus callarias, Labrus berggylta, Anguilla vulgaris.*
B. *Elasmobranchs: Squalus acanthias, Raia batis.*
C. *Cyclostomes: Myxine glutinosa.*
D. *Cephalopodes: Eledone cirrosa.*

Technique of perfusion

With the heart *in situ* a cannula was inserted into one of the entering veins, the others being ligated. In experiments with *Eledone* the cannula was in-

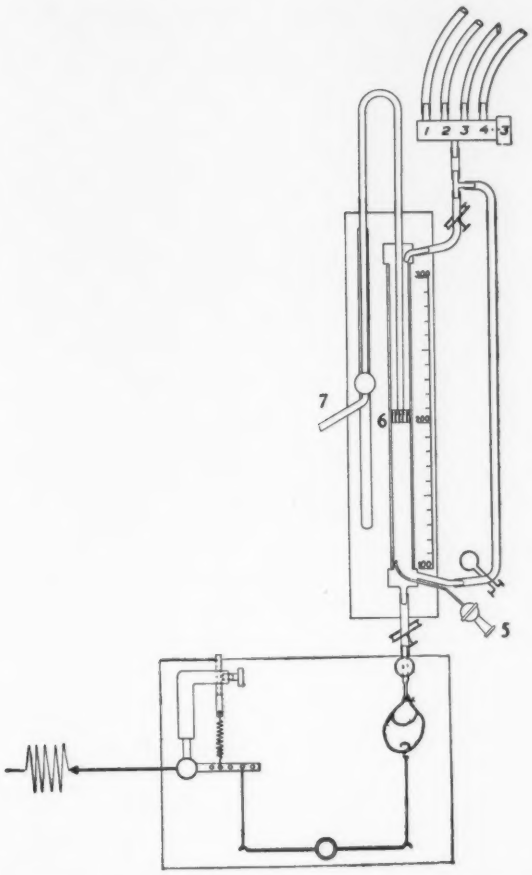


Fig. 2. Diagram showing the heart perfusion apparatus (see methods).
1—4. Adjustable pet-cock allowing four different perfusion solutions. 5. Small cannula with tap, for injection of small amounts of concentrated test substances into the perfusion chamber. 6. Vertically perforated disc adjustable for varying perfusion pressure. 7. Communication between 6 and water jet pump for removal of any excess perfusion fluid.

serted into the left auricle. The heart was then dissected out and placed in the perfusion apparatus (figs. *1*, *2*). The perfusion pressure was kept constant, generally at about 150 mm water, the pressure level chosen in accordance to the size of the actual heart. An excess of fluid was continuously supplied to the apparatus, so that the heart received more fluid when its activity increased. Constant level of perfusion fluid was obtained by means of a tube (adjustable in a vertical direction) connected with a vacuum aspirator. By this arrangement superfluous fluid could be removed by suction (fig. *2*, 6, 7). The cardiac movements were recorded on a smoked drum via a transmission apparatus in

which the heart contracted against an adequate resistance (adjustable coil spring connected with the recording pen).

Perfusion fluids

The perfusion fluids were prepared by diluting filtered sea water (salinity 3 per cent) with varying quantities of distilled water. Usually 0.5 g glucose per liter of fluid was added. The use of mixtures of sea water and distilled water as physiological saline solutions for marine vertebrates has been recommended by YOUNG (1932). During the present work the following sea water—distilled water mixtures were employed:

A. *Teleosts:* 1 part sea water and 2 parts distilled water.
B. *Selachians:* 1 part sea water and 1 part distilled water.
C. *Myxine:* 2 parts sea water and 1 part distilled water.
D. *Eledone:* undiluted sea water.

The blood of selachians contains large amounts of urea (see review by KROGH 1939) and it has been stated that it is necessary to add urea to the perfusion fluid when working with organs from selachians (FÜHNER 1908, RABBENO 1951). In our experiments with isolated hearts from *Raia* and *Squalus,* however, we found no drawbacks from omitting the urea. Concerning *Myxine* it is known that the blood of myxinoids is about isotonic with sea water (BOND, CARY & HUTCHINSON 1932). On that ground undiluted sea water could be expected to constitute a suitable perfusion fluid. However, in our experiments we found it convenient to dilute the sea water to a considerable degree (see the foregoing) because undiluted sea water had a negative intotropic effect on the isolated *Myxine* heart. This effect was possibly due to sodium ions because it was also noticed during perfusion with 3 per cent sodium chloride solution.

Temperature

The temperature of the perfusion fluids was kept at 18—20° C. Only in the case of *Myxine* were control experiments also run at a lower temperature, 6° C, which is about the temperature of the natural environment of the hagfish.

Substances used

Adrenaline hydrochloride. Synthetic adrenaline base (Rhône-Poulenc, Paris) was dissolved in N/10 hydrochloric acid, diluted with distilled water and the pH adjusted to about 4.5.

l-Noradrenaline hydrochloride. Synthetic l-noradrenaline bitartrate (Winthrop-Stearns Inc., New York) was dissolved, diluted, and the pH adjusted as with adrenaline.

VOL. 35 1954

Acetylcholine chloride (Hoffmann—La Roche, Basel).

Atropine sulphate—commercial sample.

Dihydroergotamine (methane sulphonate) (Sandoz, Basel).

Dopamine (3.4-dioxyphenylethylamine) = Hydroxytyramine hydrochloride (Sterling-Winthrop Research Institute, New York).

Physostigmin. salicylic. cryst. (E. Merck, Darmstadt).

Pilocarpine—commercial sample.

Tyramine hydrochloride (Hoffmann—La Roche, Basel).

For perfusion purposes small amounts of newly prepared solutions (slightly acidified distilled water solutions) were added to samples of the perfusion fluids. Due to the pH of the perfusion solutions, which was above 8, the adrenaline in particular was rapidly destroyed, wherefore all diluting was made immediately before the tests. Breaking down of catechol amines could also be avoided by injecting them in concentrated form directly into the perfusion chamber. This gave an instantaneous dilution in a small volume of fluid which passed through the heart before any appreciable breakdown could be observed.

RESULTS

A. TELEOSTS

Gadus callarias. The isolated cod heart shows a spontaneous frequency of 20—25 beats per minute. Both adrenaline and noradrenaline have a positive inotropic and chronotropic action, adrenaline being the more active of the two substances (fig. 3). The observed activity ratio adrenaline/noradrenaline was about 30. Dopamine has the same effect as adrenaline or noradrenaline but is less active. Thus with a concentration of 10^{-6} of this drug there is acceleration but no increase of amplitudes. Tyramine is without effect in concentrations between 1×10^{-6} and 1×10^{-5}.

In the experiments illustrated in figure 3 the concentration of adrenaline and noradrenaline employed caused an increase of frequency from about 20 to 42—44 beats per minute.

Labrus berggylta. The heart of this species is unlike that of *Gadus* both in appearance and behaviour. The ventricle has a very characteristic orange-red tint (due to an abundance of respiratory enzymes?) and the heart produces more powerful contractions and continues working for a longer time than the cod heart. The spontaneous frequency of the isolated heart is 14—15 beats per minute.

Adrenaline and noradrenaline cause a marked acceleration (fig. 4, 1, 2) but have very slight influence upon the amplitudes. The activity ratio adrenaline/noradrenaline was found to be about 2 : 1.

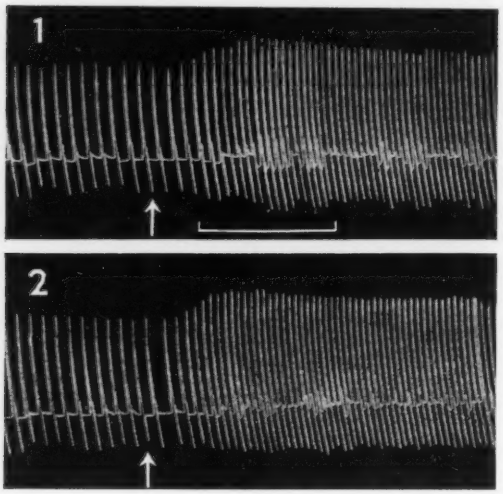


Fig. 3. *Gadus callarias.* Heart perfusion in vitro.

		Frequency/min before	during
1. Adrenaline	6×10^{-8}	20	42
2. Noradrenaline	1×10^{-6}	22	44

Time indication = 30 sec.
Activity ratio adrenaline/noradrenaline 30 : 1.

VOL. 35 1954

Tyramine and dopamine were tried in doses of 1×10^{-6} or 1×10^{-5}. The drugs probably have a slight positive chronotropic effect.

Acetylcholine has a complex effect (fig. 4, 3) causing periods of inhibition interchanged with periods of more frequent contractions.

Anguilla vulgaris. The spontaneous frequency of the heart is about 20 beats per minute.

Adrenaline in a concentration of 1×10^{-7} causes increased frequency from 22 beats per minute to 30 per minute. An equivalent dose of noradrenaline has almost the same action (fig. 5, 1, 2). Besides this positive chronotropic action a slight positive inotropic effect is also seen after these drugs (fig. 5, 1, 2).

Dopamine (conc. 10^{-5}) produces a slight augmentation of the frequency (fig. 5, 3).

The activity ratio adrenaline/noradrenaline was estimated to about 1 : 1, the ratio adrenaline/dopamine to between 50 : 1 and 100 : 1.

B. SELACHIANS

Squalus acanthias. The isolated dogfish heart beats with a spontaneous frequency of 26—28 per minute.

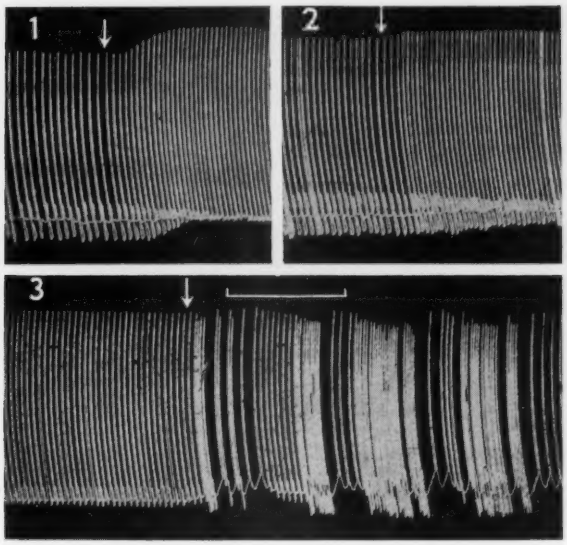


Fig. 4. *Labrus berggylta.* Heart prefusion in vitro.

		Frequency/min before	during
1. Adrenaline	1.2×10^{-7}	32	48
2. Noradrenaline	2×10^{-7}	34	48
3. Acetylcholine	2×10^{-7}		

Time indication = 30 sec.
Activity ratio adrenaline/noradrenaline 2 : 1.

Adrenaline has a marked augmentative effect upon the amplitudes (fig. *6*, 1, 2) but has only a weak acceleratory effect. During perfusion with adrenaline in a concentration of 10^{-7} there was observed an increase in frequency from initially 26 beats per minute to 34 per minute. The threshold value for adrenaline was $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-9}$.

Noradrenaline produces the same effects as adrenaline (fig. *6*, 3) but is much less active. The activity ratio adrenaline/noradrenaline is about 100 : 1.

In some experiments an initial inhibitory effect was observed after small doses of adrenaline or noradrenaline (cf. ÖSTLUND 1954 p. 58). This effect could be blocked by atropine.

Dopamine has a positive inotropic effect similar to adrenaline (fig. *6*, 4) and noradrenaline but is much less active. The activity ratio adrenaline/dopamine exceeds 1 000 : 1.

Acetylcholine has a negative chronotropic and inotropic effect (fig. *6*, 5).

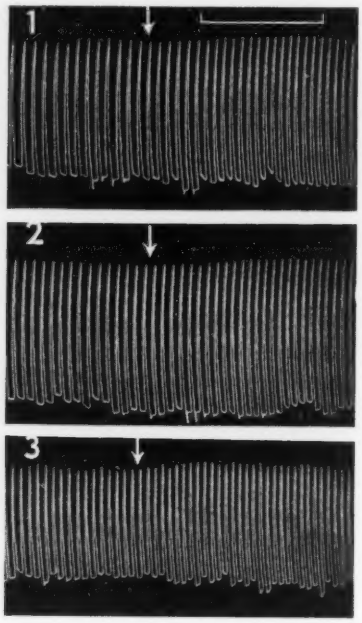


Fig. 5. *Anguilla vulgaris.* Heart perfusion in vitro.

		Frequency/min before	during
1. Adrenaline	1×10^{-7}	22	30
2. Noradrenaline	1×10^{-7}	24	32
3. Dopamine	1×10^{-5}	30	36

Time indication = 30 sec.
Activity ratio adrenaline/noradrenaline 1 : 1.

VOL. 35 1954

Raia batis

The spontaneous frequency of the isolated heart was 21 beats per minute.

Adrenaline and noradrenaline have a strong positive inotropic effect and a weak chronotropic effect. In most cases moderate doses of adrenaline or noradrenaline produced an initial arrest of the heart (fig. 7, 1, 5) which could be blocked by atropine (fig. 7, 2, 6). The activity ratio adrenaline/noradrenaline was 4—10 : 1.

An aqueous extract from the interrenal organ of *Squalus* produced on the *Raia* heart an effect completely comparable to that of adrenaline or noradrenaline (fig. 7, 3, 4). Even in this case the initial inhibitory action is abolished by atropine. According to SHEPHERD & WEST (1953) and SHEPHERD, WEST and ERSPAMER (1953) the chromaffin tissue in the immediate surroundings of the interrenal organs of dogfish contains adrenaline and noradrenaline (cf. also ÖSTLUND, 1954).

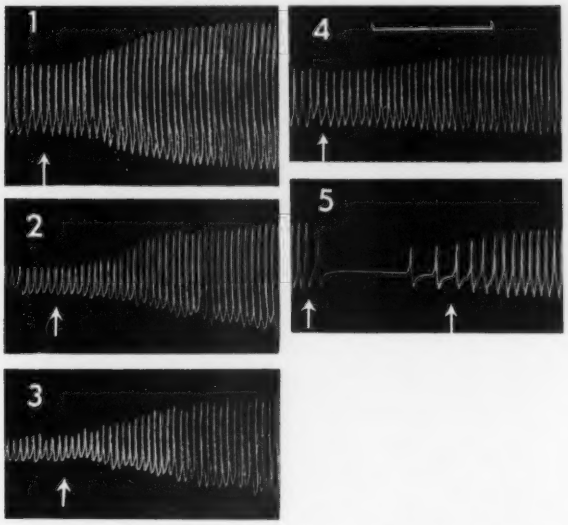


Fig. 6. *Squalus acanthias.* Heart perfusion in vitro.

		Frequency/min before	during
1. Adrenaline	1×10^{-7}	26	34
2. „	1×10^{-8}	28	34
3. Noradrenaline	1×10^{-6}	28	34
4. Dopamine	1×10^{-5}	26	34
5. Acetylcholine	5×10^{-7}		

Time indication = 30 sec.
Activity ratio adrenaline/noradrenaline 100 : 1.

The sensitivity of the ray heart to adrenaline and noradrenaline seems to be somewhat lower than that of the dogfish heart. Thus the threshold value for adrenaline was about 1×10^{-8} and for noradrenaline 10^{-7}. However, large individual differences occur.

Tyramine and dopamine show a slight positive inotropic effect when given in large doses.

C. CYCLOSTOMES

Myxine glutinosa

During perfusion with saline solution the isolated *Myxine* heart generally keeps on working in a constant even rhythm (about 30 beats per minute) for more than 24 hours. Sometimes, however, there appear typical rhythmical irregularities in the amplitudes, probably due to different degrees of auriculo-ventricular block.

Adrenaline and noradrenaline in concentrations between 10^{-9} and 10^{-4} usually produce no obvious effects on the isolated *Myxine* heart. In a few

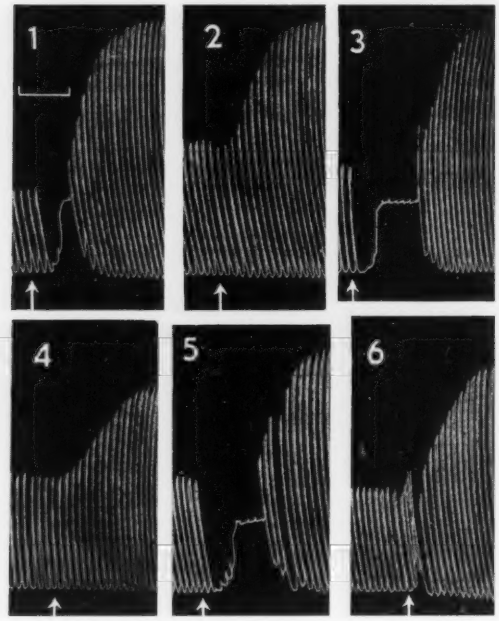


Fig. 7. *Raia batis.* Heart perfusion in vitro.

		Frequency/min before	during
1. Adrenaline	1.5×10^{-7}	21	24
Between 1 and 2 atropine 3 min.	5×10^{-6}	21	21
2. Adrenaline	1.5×10^{-7}	21	24
3. Extract from interrenal organ Squalus acanthias	2.5×10^{-5}	21	24
4. As 3 after atropine	2.5×10^{-5}	21	24
5. Noradrenaline	6×10^{-7}	24	21
6. As 5 after atropine	6×10^{-7}	24	24

Time indication = 30 sec.
Activity ratio adrenaline/noradrenaline 4 : 1.

cases, however, we have observed a periodical block (fig. *8*, 1) or a very slight increase of the frequency.

Dihydroergotamine (conc. 10^{-5}) generally has a slight negative chronotropic and inotropic effect. During conduction block produced by noradrenaline the same substanse has a regularizing influence (fig. *8*, 2).

After pretreatment with dihydroergotamine (conc. 10^{-5}) the *Myxine* heart becomes sensitive towards adrenaline and noradrenaline and shows distinct positive inotropic and chronotropic responses after rather small doses (conc. 10^{-8}—10^{-6}; fig. *8*, 3). This sensitizing effect seems to continue for several hours after a single dose of dihydroergotamine.

No effects were observed from dopamine, tyramine or acetylcholine given in concentrations between 10^{-9} and 10^{-4}.

VOL. 35 1954

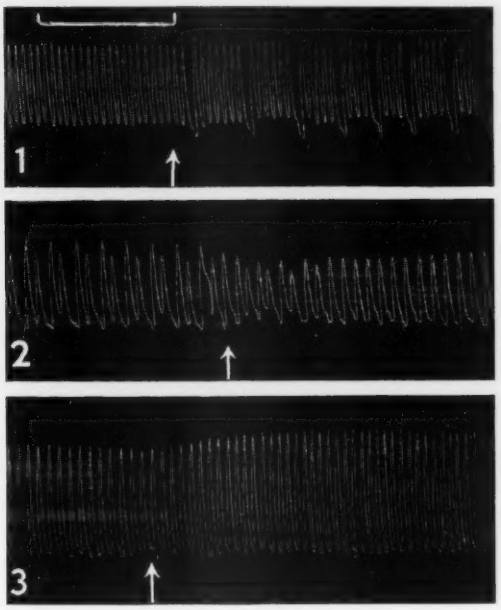


Fig. 8. *Myxine glutinosa.* Heart perfusion in vitro.

		Frequency/min before	during
1. Noradrenaline	0.2×10^{-7}		
2. Dihydroergotamine (immediately after a small dose of noradrenaline)	10^{-5}		
3. Noradrenaline (after pretreatment with dihydroergotamine)	10^{-6}	26	34

Time indication = 30 sec.

The *Myxine* heart shows very distinct responses to changes in the ionic medium. Potassium chloride (conc. about 10^{-2}) diminishes the amplitudes and finally arrests the heart in diastole. Addition of calcium chloride strengthens the amplitudes of the contractions when given in small amounts. Larger concentration of calcium causes irregular rhythm and finally arrest in systole. Thus the ionic antagonism between calcium and potassium can be demonstrated as readily on the hagfish heart as, for instance, upon the frog's heart.

Several experiments with the isolated Myxine heart were run at a low temperature (6° C). No notible changes in the drug responses were seen at this temperature.

D. CEPHALOPODES

Eledone cirrosa

The isolated ventricle of the *Eledone* heart is a very good preparation for experimental work. When perfused with undiluted sea water it still beats with

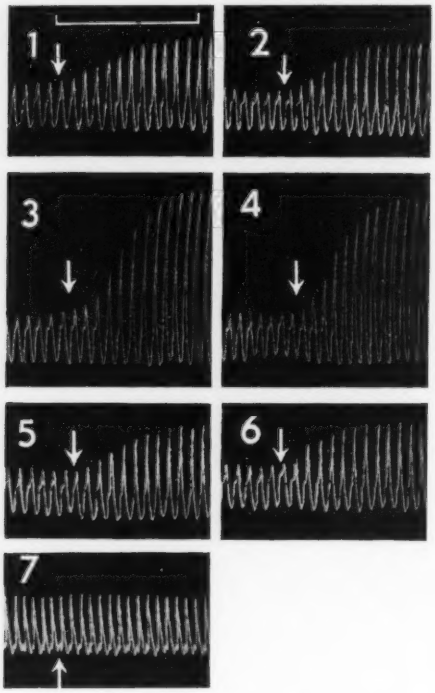


Fig. 9. *Eledone cirrosa.* Heart perfusion in vitro.

		Frequency/min before	during
1. Adrenaline	2×10^{-9}	24	26
2. Noradrenaline	2×10^{-9}	24	28
3. Adrenaline	1×10^{-8}	24	28
4. Noradrenaline	1×10^{-8}	26	28
5. Dopamine	5×10^{-6}	24	24
6. Tyramine	5×10^{-6}	24	24
Between 6 and 7 Dihydroergotamine for 3 min followed by perfusion of sea water for 10 min	1×10^{-5}	24	28
7. Adrenaline	5×10^{-8}	28	28

Time indication = 30 sec.
Activity ratio adrenaline/noradrenaline 1 : 1.

an even rhythm after 24—48 hours. The spontaneous frequency of the isolated ventricle is 24—26 beats per minute.

Adrenaline and *noradrenaline* produce a strong positive inotropic and a moderate positive chronotropic effect (fig. 9, 1, 2, 3, 4). The threshold value was 1×10^{-10} for both substances. *Tyramine* and *dopamine* have a positive inotropic effect but only when given in rather high concentrations (fig. 9, 5, 6). *Dihydroergotamine* (conc. 10^{-5}) has a prolonged positive inotropic effect. After *adrenaline* or *noradrenaline*, recovery is obtained within 10 min-

VOL. 35 1954

utes of perfusion with fresh sea water but the effect from dihydroergotamine is still visible after more than 30 minutes. When recovering from *dihydroergotamine* the ventricle is almost insensitive to *adrenaline* (fig. 9, 7).

Our observations concerning the effects of *adrenaline, noradrenaline, dihydroergotamine* and *tyramine* on the heart of *Eledone* are in good agreement with observations upon other cephalopod species by BACQ (1933, 1934), KRUTA (1935, 1936) and ERSPAMER & GHIRETTI (1951).

Discussion

When considering the results of the present comparative pharmacological study certain characteristic differences in the responses of hearts from different species are conspicuous.

Adrenaline is reported by several investigators to have a stimulatory influence upon the selachian heart (MACDONALD 1925, LYON 1926, HUNTSMAN 1931, ROTH 1935, RABBENO 1951) but an inhibitory effect has also been noticed (MACDONALD 1925, LUTZ 1930, HUNTSMAN 1931, HIATT 1943). The inhibitory "vagomimetic" effect from adrenaline is said to occur either initially or after large doses. According to HIATT (1943) the inhibitory effect from adrenaline cannot be abolished by atropine. In our own experiments we observed an initial inhibitory effect from adrenaline upon the isolated heart of both *Raia* and *Squalus*, and this effect could be blocked by atropine (fig. 7, 2). This finding indicates that the effect might be due to liberation of acetylcholine from some source. Vagal elements in the heart could be the possible source of acetylcholine because the selachian heart is known to receive inhibitory fibres via the vagus.

While an inhibitory innervation by the vagus nerve of the selachian and the teleostean heart has been demonstrated repeatedly (for references vide NICOL 1952), hitherto no cardiac augmentor nerves have been found in these animal groups.

However, IZQUIERDO (1930), working with *Scyllium* observed that after atropinization, stimulation of the sinus venosus part of the heart causes increase in frequency and amplitudes. Whether vagal stimulation after atropinization causes stimulation of the heart is unknown. In teleosts the intestinal branch of the vagus probably carries adrenergic impulses to certain visceral smooth muscles (swimbladder mucosa; FÄNGE 1953).

The finding by ÖSTLUND (1954) that extract of the heart of *Myxine* contains high amounts of adrenaline and noradrenaline is interesting in view of the fact that the organ is very insensitive to these drugs. Whether the presence of those catechol amines in the hagfish heart are due to sympathetic nerve fibres, or chromaffin cells is not known.

In contradiction to our findings on *Myxine* it is stated by ITINA (1943)

that the cyclostome heart is excited by acetylcholine. Most probably this author worked with *Petromyzon*, which is provided with cardioregulative nerves in contrast to what is known about *Myxine* (CARLSON 1904, 1906).

Although an invertebrate *Eledone* has a heart which pharmacologically shows large similarities to the vertebrate heart. In similarity with BACQ (1933), KRUTA (1935) and ERSPAMER & GHIRETTI (1951) we found that tyramine has a positive inotropic and chronotropic effect upon the cephalopod heart but it is several hundred times less active then adrenaline. We can also confirm the observation by ERSPAMER & GHIRETTI that the cephalopod heart is very sensitive to noradrenaline. Not all molluscan hearts respond to adrenaline. Thus insensitivity towards adrenaline is found in the hearts of *Helix* (BOYER 1927, ERSPAMER & GHIRETTI 1951), *Aplysia* (EULER et al. 1952) and *Anodonta* (FÄNGE 1954). On the hearts of several molluscans 5-hydroxytryptamine has a much more potent excitatory effect than adrenaline and noradrenaline (ERSPAMER & GHIRETTI 1951, FLOREY & FLOREY 1954, WELSH 1954). According to the observations of one of us the heart of the fresh water mussel *Anodonta* does not react to moderate doses of adrenaline or noradrenaline, but reacts with an increase in amplitudes for a concentration of 10^{-9} of 5-hydroxytryptamine (FÄNGE 1954).

The cardiac effects of tyramine and dopamine are very weak and although these amines occur naturally in certain animal organs they are probably not of importance as cardioregulative substances.

VOL. 35 1954

SUMMARY

1) Adrenaline and noradrenaline produce positive inotropic and chronotropic effects on the heart of the examined teleosts, elasmobranchs and *Eledone*. Tyramine and dopamine produce adrenomimetic effects if they are given in high doses. In the concentration range 10^{-8}—10^{-5} they are usually without effect.

2) On the hearts of *Squalus, Raia* and *Eledone* the inotropic effect from adrenaline or noradrenaline is more pronounced than the chronotropic one. On the hearts of the teleostean species (*Gadus, Labrus, Anguilla*) the chronotropic effect predominates.

3) The activity ratio adrenaline/noradrenaline varies from about 1 : 1 in *Anguilla* and *Eledone* to about 50—100 : 1 in *Squalus*. Intermediate values were found for *Raia, Labrus* and *Gadus*.

4) On the heart of *Raia* and *Squalus* adrenaline and noradrenaline often produce an initial inhibitory effect which is abolished by atropine. It was

concluded that this effect is probably due to stimulation of cholinergic elements in the heart.

5) Usually no distinct responses are obtained on the heart of *Myxine* with adrenaline, noradrenaline, tyramine or dopamine. After pretreatment with dehydroergotamine, however, adrenaline and noradrenaline have a positive chronotropic and inotropic action.

No inhibitory action could be obtained on the heart of *Myxine* with acetylcholine.

Our sincere thanks are due to Prof. Nils Holmgren and Dr. Gunnar Gustafson for working facilities and generous supply of material. We also wish to thank Professor U. S. von Euler, of the Physiology Department of the Karolinska Institute Stockholm for his stimulating interest and advice during the course of this study.

We are also indebted to Dr. I. Agrell, the Department of Zoophysiology, Lund, for advice and discussions.

REFERENCES

Beauvallet, M. 1937. Inversion des effets d'une substance contracturante par une autre substance contracturante. C. R. Soc. Biol., *124*.

Beresin, W. I. 1913. Über den Einfluss der Gifte auf das isolierte Fischherz. Pflügers Arch., *150:* 549.

Bacq, Z. M. 1933. Action de l'adrenaline, de l'ergotamine et de la tyramine sur le ventricule médian isolé de Loligo pealii C. R. Soc. Biol., *114:* 1358.

— 1934. Recherches sur la physiologie du système nerveux autonome. V. Réactions du ventricule médian, des chromatophores et divers organes isolés d'une mollusque céphalopode (Loligo pealii) à l'adrénaline, l'acétylcholine, l'ergotamine, l'atropine et aux ions K, Ca et Mg. Arch. int. Physiol., *38:* 138.

Bond, R. M., Cary, M. K. & Hutchinson, G. E. 1932. A note on the blood of hag-fish Polistotrema stouti. J. exp. Biol., *9:* 12.

Boyer, P. 1927. Action de l'adrenaline et de la sparteine sur le cœur de l'Escargot. C. R. Soc. Biol., *95:* 1244.

Carlson, A. J. 1904. Contributions to the physiology of the California hagfish (Bdellostoma dombeyi). Zschr. allg. Physiol., *4:* 259.

— 1906. The presence of cardioregulative nerves in the lampreys. Am. J. Physiol., *16:* 230—232.

Clark, A. J. 1927. Comparative physiology of the heart. Cambridge.

Dubuisson, M. 1933. La physiologie du muscle cardiaque des invertébrés. Paris.

Erspamer, V. & Ghiretti, F. 1951. The action of enteramine on the heart of molluscs. J. Physiol., *115:* 470.

Euler, U. S. v. 1951. The nature of Adrenergic Nerve Mediators. Pharmacol. Rev., *3:* 247.

— 1952. Presence of Catechol Amines in Visceral Organs of Fish and Invertebrates. Acta Physiol. Scand., *28:* 297.

Euler, U. S. v., Chaves, N. & Teodosio, N. 1952. Effect of acetylcholine, noradrenaline,

adrenaline and histamine on isolated organs of *Aplysia* and holothuria. Acta Physiol. Latinoam., *2:* 101.

EULER, U. S. v., HAMBERG, U. & HELLNER, S. 1951. β-(3:4-Dihydroxyphenyl) ethylamine (hydroxytyramine) in Normal Human Urine. Biochem. J., *49:* 655.

FÄNGE, R. 1951. The mechanisms of gas transport in the euphysoclist swimbladder. Acta Physiol. Scand., *30,* Suppl. 110.

— 1954. (to be published).

FLOREY, E. and FLOREY, E. 1954. Über die mögliche Bedeutung von Enteramin (5-Oxy-Tryptamin) als nervöser Aktionssubstanz bei Cephalopoden und dekapoden Crustaceen. Zschr. f. Naturforsch., *9 b:* 58.

FREDERICQ, H. 1947. Les nerfs cardio-régulateurs des invertébrés et la theorie des médiateurs chimiques. Biol. Rev., *22:* 297.

FREDERICQ, H. & BACQ, Z. M. 1939. Analyse quantitative des effets cardiaques de la stimulation du nerf viscéral des céphalopodes. Arch. internat. Physiol., *49:* 490—496.

FÜHNER, H. 1908. Ueber eine Speisungsflüssigkeit für Selachierherzen. Zschr. f. allg. Physiol., *8:* 485.

GREGERMAN, R. I. 1952. Adrenaline and hydroxytyramine in the parotid gland venom of the toad, *Bufo marinus.* J. Gen. Physiol., *35:* 483.

GOODALL, Mc. C. 1951. Studies of Adrenaline and Noradrenaline in Mammalian Heart and Suprarenals. Acta Physiol. Scand., *24,* Suppl. 85.

HANSTRÖM, B. 1939. Hormones in Invertebrates. Oxford.

HENZE, M. 1913. p-Oxyphänylamin, das Speicheldrüsengift der Cephalopoden. Zschr. Physiol. Chem., *87:* 51.

HIATT, E. P. 1943. The action of adrenaline, acetylcholine and potassium in relation to the innervation of the isolated auricle of the spring dogfish (Squalus acanthias) Am. J. Physiol., *139:* 45.

HUNTSMAN, M. E. 1931. The effect of certain hormone-like substances on the isolated heart of the skate. Contr. Canad. Biol. Fish. N. S. *7:* 31.

ITINA, N. A. 1947. Certain pecularities of muscular reaction of lower vertebrates to vegetative poisons. Byull. Eksptl. Biol. Med. (Moscow), *11:* 517. (ref. Chem. Abstr., *41:* 6348).

IZQUIERDO, J. J. 1930. On the influence of the extra-cardiac nerves upon the sino-auricular conduction in the heart of Scyllium. J. Physiol., *69:* 29.

JULLIEN, A. & RIPPLINGER, J. 1950. De l'action comparée de quelques drogues sur le caur des Poissons marins, Rôle éventuel de l'océtylcholine comme médiateur et systématisation du pneumogastrique. Ann. sci. univ. Besançon (Zool. et physiol)., *5:* 25.

KROGH, A. 1939. Osmotic regulations in aquatic animals. Cambridge.

KRUTA, V. 1935. Sur l'action de l'adrénaline, de l'ergotamine et du pipéridinométhylbenzodioxane sur le cœur de la Seiche. C. R. Soc. Biol., *119:* 397.

— Sur l'action de l'acetylcholine et de l'atropine sur le cœur de Sepia officinalis. C. R. Soc. Biol., *119:* 608.

— 1936. Action de quelques alcaloides sur le nerfs cardiaques chez les Céphalopodes. C. R. Soc. Biol., *122:* 585.

— Action des poisons du système nerveux autonome sur le cœur isolé de la Seiche. J. Physiol. Path. gén., *34:* 65.

LUTZ, B. R. 1930. The innervation of the heart of the Elasmobranch Scyllium canicula. Am. J. Physiol., *93:* 669.

— The effect of adrenaline on the auricle of elasmobranch fishes. Am. J. Physiol., *94:* 135.

LYON, E. P. 1926. A study of circulation, blood pressure and respiration of sharks. J. Gen. Physiol., *8:* 279.

VOL. 35 1954

MacDonald, A. D. 1925. Action of adrenaline on the perfused fish heart. Quart. J. Exper. Physiol., *15:* 69.

Nicol, J. A. C. 1952. Autonomic nervous system in lower chordates. Biol. Rev., *27:* 1.

Östlund, E. 1954. The distribution of catechol amines in lower animals and their effect on the heart. Acta Physiol. Scand., *31,* Suppl. 112.

Prosser, C. L. et al. 1950. Comparative animal physiology. Philadelphia.

Rabbeno, A. 1951. Correlazioni fra interrenale e chromaffine: Nota IV. L'associazione adrenalina: endocorticalina sul cuore isolato di Scyllium canicula. Arch. int. pharmacodyn., *85:* 159.

Roth, G. 1935. Pharmacological evidence for cardio-regulative nerves in the skate. Arch. int. Pharmacodyn., *49:* 355.

Shepherd, D. M. & West, G. B. 1953. Differentiation of chromaffin cells. J. Pharmacol., *5:* 216.

Shepherd, D. M., West, G. B. & Erspamer, V. 1953. Chromaffin bodies of various species of dogfish. Nature, *172:* 509.

Ungar, G. 1937. Recherches sur les processus humoraux consécutifs à l'excitation nerveuse chez les Céphalopodes. Ann. Physiol. Physicochim. Biol. Belg., *13:* 304.

Welsh, J. H. 1954. Hydroxytryptamine: A neurohormone in the invertebrates. Federation Proceedings, *13:* 162.

Wense, Th. v. 1938. Wirkungen und Vorkommen von Hormonen bei wirbellosen Tieren. Lpz.

Young, J. Z. 1932. The Preparation of Isotonic Solutions for Use in Experiments with Fish. Pubbl. d. Staz. Zool. Napoli, *12:* 425.

L.
5
54